



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

Producción de embriones caprinos a partir de ovocitos madurados *in vitro* y vitrificados por el método cryotop.

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS.

Fátima Betsabé González Silvestry.

Tutor: Salvador Romo García (FESC)

Comité tutor:

Alfredo Medrano Hernández (FESC)

Ma. Teresa Paramio Nieto (UAB)

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, marzo de 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis hijos, los dos luceros de mi vida, mi inspiración diaria.

A mis padres y hermanas, que en el día a día con su apoyo, respaldo y cariño me impulsan a salir adelante, mis logros también son los suyos.

A Sergio, por haber estado ahí desde el principio en las buenas, en las malas y en las peores, sin tu apoyo no lo hubiera logrado.

Agradecimientos:

A la UNAM, la máxima casa de estudios y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por darme las herramientas necesarias para la realización de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención con número de registro 424711 para la realización del doctorado.

A mi tutor el Dr. Salvador Romo García por tener la paciencia de aguantar tanto tiempo y apoyarme en la realización de este estudio.

A mi comité tutor, Dra. Maria Teresa Paramio y Dr. Jose Alfredo Medrano, quienes durante cada revisión semestral, sus correcciones y aportaciones fueron invaluable y me ayudaron a sentar bien las bases del estudio que a veces iba en 1000 direcciones.

A las Dras. Teresa Mogas y Dolors Izquierdo de la Universidad Autónoma de Barcelona que sin duda me ayudaron a mejorar las técnicas utilizadas en Fecundación *In vitro* en Caprinos y Vitrificación de Ovocitos y por hacer de mi estadía en Barcelona fuera mejor aprovechada.

A la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro †, que aparte de colaborar sustantivamente en la realización de este trabajo, sus consejos, enseñanzas y jalones de oreja quedarán siempre en mi mente y en mi corazón. Le debo, no dejarme “tirar la toalla” e insistirme tanto en terminar. GRACIAS, NUNCA LO OLVIDARÉ.

A las Dras. Irasema Chirino e Ingrid Medina, de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por recibirme en su laboratorio y su apoyo incondicional en la terminación del artículo publicado.

A la Dra. Lyda Yuliana Parra por su apoyo en la realización de las técnicas inmunohistológicas y su interpretación.

A los Dres. Michael E. Kjelland y Benito López Baños por su apoyo en la escritura del artículo.

A los miembros del Jurado los Dres. Erika Alina Ordóñez, Jose Ernesto Pichardo, Mario Pérez Martínez, Rodolfo Canseco. Gracias porque con sus aportaciones ayudaron a mejorar el contenido de esta tesis.

RESUMEN.

La vitrificación de ovocitos caprinos y la Producción *In Vitro* de Embriones (PIVE), abren la posibilidad de la obtención de crías aun después de la muerte de la donante, hembras prepúberes o con alguna imposibilidad para gestar, así como almacenar gametos de hembras de alta calidad genética, para una mejor comercialización y conservación. El objetivo de este estudio fue vitrificar ovocitos madurados *in vitro* en cryotop, para posteriormente fecundarlos y obtener embriones de calidad transferibles. El experimento se dividió en tres etapas, I. Obtención y maduración de ovocitos *in vitro*. II. Vitrificación de Ovocitos madurados *in vitro*, III. Fecundación y Cultivo de embriones *in vitro*. Se obtuvieron ovarios de hembras sacrificadas en rastro. Los Complejos Cúmulo Ovocitos (COC's) obtenidos se clasificaron según su morfología y se seleccionaron aquellos ovocitos con citoplasma homogéneo y mas de 2 capas de células del cúmulo. Para la parte I, los COC's seleccionados se maduraron *in vitro* (MIV) manteniéndolos en Medio de Maduración (MM) a base de TCM 199 adicionado con BSA, FSH, LH, ácido pirúvico y penicilina-estreptomocina y puestos en una incubadora durante 27 h con una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de aire, humedad a saturación y temperatura de 38.5 °C. Para la parte II los ovocitos se dividieron en 3 grupos: Grupo 1 o control (ovocitos madurados *in vitro*), Grupo 2 o CPA's Exp (ovocitos madurados *in vitro* y expuestos a soluciones crioprotectoras sin vitrificarlos), Grupo 3 o vitrificados (ovocitos madurados *in vitro*, expuestos a soluciones crioprotectoras y vitrificados en Nitrógeno Líquido (NL)), la solución crioprotectora contenía Medio 199H, EtilenGlicol, DMSO y Sucrosa. Después de la vitrificación un porcentaje de cada grupo fue evaluado para estudiar el efecto de los crioprotectores y la vitrificación sobre la distribución de cromosomas y la integridad de microtúbulos mediante la técnica de inmunohistoquímica, esto con el objetivo de evaluar su viabilidad después de cada tratamiento. Por último, los ovocitos restantes fueron fertilizados con espermatozoides previamente capacitados. Se evaluó el desarrollo embrionario obtenido a las 72 horas pos-fecundación (hpf), y a los 5, 6 y 7 días pos-fecundación (dpf) y se determinó el porcentaje de embriones producidos por cada tratamiento, así como su calidad. En el análisis de la organización cromosómica el grupo control mostró una organización normal de 49.2%, 32.14% de cromosomas dispersos y

18.57% de cromosomas descondensados, en el grupo expuesto a los crioprotectores se encontró 46.8%, 30.85% y 22.34% de cromosomas normales, dispersos y descondensados respectivamente, no mostrando diferencia estadística, para el grupo de ovocitos vitrificados se encontró un número de cromosomas normales, dispersos y descondensados de 37.14%, 24.29% y 38.57% respectivamente, demostrando un aumento significativo en éste último ($p < 0.01$). La organización de microtúbulos mostró un 44.3% de disposición normal, 35% de microtúbulos desorganizados y un 20.71% de microtúbulos ausentes en el grupo control. En el grupo CPA's Exp se obtuvieron porcentajes de 30.9%, 33% de microtúbulos normales y desorganizados sin mostrar diferencias con el grupo control y un 36.17% de microtúbulos ausentes, teniendo éste último una diferencia estadística ($p < 0.01$). El grupo de ovocitos vitrificados tuvo 24.3% de microtúbulos normales estadísticamente menor que el grupo control ($p < 0.01$) y 45.71% de microtúbulos ausentes significativamente aumentado que el grupo control ($p < 0.01$). La división embrionaria y el porcentaje de blastocisitos fueron significativamente menores en los obtenidos a partir de ovocitos vitrificados comparados con los obtenidos del grupo control.

En éste trabajo se encontró que los ovocitos caprinos madurados *in vitro* son sensibles a la exposición de los CPA's y al proceso de vitrificación, aumentando la desorganización de cromosomas en su placa metafásica e impidiendo la formación de microtúbulos, lo que conlleva a una falla en la capacidad de completar la segunda meiosis y en la producción de embriones viables capaces de llegar a la formación blastodérmica.

Palabras clave: criopreservación, cromosomas, inmunohistoquímica, maduración *in vitro*, ovocitos caprinos, producción *in vitro* de embriones, vitrificación.

ABSTRACT.

The vitrification of goat oocytes and In Vitro Embryo Production (PIVE) open the possibility of obtaining offspring even after the death of the donor, from prepubertal females or from those with some impossibility to get pregnant, as well as to store gametes from females of high genetic quality for better marketing and conservation. The aim of this study was to vitrify oocytes matured *in vitro* in Cryotop devices, to later warm and fertilize them to obtain transferable quality embryos. The experiment was divided into three stages: I. Collection and *in vitro* maturation of oocytes, II. Vitrification of *in vitro* matured oocytes, III. *In vitro* fertilization of oocytes and *in vitro* culture of the resulting embryos. Ovaries were obtained from slaughtered females. The Cumulus Oocyte Complexes (COC's) obtained were classified according to their morphology and those oocytes with homogeneous cytoplasm and more than 2 layers of cumulus cells were selected. For part I, the selected COC's were matured *in vitro* (IVM) keeping them in Maturation Medium (MM) based on TCM 199 added with BSA, FSH, LH, pyruvic acid and penicillin-streptomycin, and placed in an incubator for 27 h, with an atmosphere of 5% CO₂, 95% air, humidity at saturation and at a temperature of 38.5 °C. For part II, the oocytes were divided into 3 groups: Group 1 or control (oocytes matured *in vitro*), Group 2 or CPA's Exp (oocytes matured *in vitro* and exposed to cryoprotective solutions without vitrifying them), Group 3 or vitrified (oocytes matured *in vitro*, exposed to cryoprotective solutions and vitrified in Liquid Nitrogen (NL)), the cryoprotective solution contained Medium 199H, Ethylene Glycol, DMSO and Sucrose. After vitrification, a percentage of oocytes from each group was evaluated to study the effect of cryoprotectants and vitrification on chromosome distribution and microtubule integrity using the immunohistochemical technique, in order to assess their viability after each treatment. Finally, the remaining oocytes were fertilized with previously capacitated sperm. The embryonic development obtained at 72 hours post-fertilization (hpf), and at 5, 6 and 7 days post-fertilization (dpf) was evaluated, and the percentage of embryos produced by each treatment was determined, as well as their quality. In the analysis of the chromosomal organization, the control group showed a normal organization of 49.2%, 32.14% of dispersed chromosomes and 18.57% of decondensed chromosomes, in the CPA's Exp group 46.8%, 30.85% and 22.34% of normal, dispersed

and decondensed chromosomes were found, respectively, showing no statistical difference. For the group of vitrified oocytes, the numbers of normal, dispersed and decondensed chromosomes were 37.14%, 24.29% and 38.57% respectively, demonstrating a significant increase in the last one ($p < 0.01$). Microtubule organization showed 44.3% normal arrangement, 35% disorganized microtubules, and 20.71% absent microtubules in the control group. In the CPA's Exp group, percentages of 30.9%, 33% of normal and disorganized microtubules were obtained, without showing differences with the control group, and 36.17% of absent microtubules, with the latter showing a statistical difference ($p < 0.01$). The group of vitrified oocytes had 24.3% normal microtubules, statistically lower than the control group ($p < 0.01$) and 45.71% absent microtubules, significantly increased as compared to the control group ($p < 0.01$). The embryonic division and the percentage of blastocysts were significantly lower in vitrified oocytes, compared to oocytes from the control group.

This work showed that goat oocytes matured *in vitro* are sensitive to the exposure of CPA's and to the vitrification process, increasing the disorganization of chromosomes in their metaphase plate and preventing the formation of microtubules, which leads to a failure in the ability to complete the second meiosis and in the production of viable embryos capable of reaching blastodermal formation.

Keywords: chromosomes, cryopreservation, goat oocytes, *in vitro* embryo production, *in vitro* maturation, immunohistochemistry, vitrification.

INDICE

Agradecimientos:	II
RESUMEN.	III
ABSTRACT.	V
Lista de tablas.	IX
Lista de Figuras.	IX
Abreviaturas y siglas usadas	X
1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica.	3
2.1. <i>Fisiología del ovocito.</i>	3
2.2. <i>Foliculogénesis</i>	5
2.2.1. <i>La transición del folículo primordial al folículo primario.</i>	5
2.2.2. <i>Desarrollo del folículo antral.</i>	5
2.2.3. <i>Dinámica folicular: Selección, crecimiento y dominancia de las ondas foliculares.</i> .7	
2.2.4. <i>Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito.</i>	10
2.3. <i>Evaluación de la maduración y viabilidad de ovocitos.</i>	14
2.4. <i>Criopreservación de ovocitos y embriones caprinos.</i>	14
2.4.1. <i>Diferencias entre congelación y vitrificación.</i>	16
2.4.2. <i>Técnicas de vitrificación de ovocitos y embriones.</i>	17
2.4.3. <i>Crioprotectores utilizados en la vitrificación de ovocitos y embriones caprinos y sus efectos sobre la viabilidad.</i>	20
2.4.4. <i>Efecto de la vitrificación y el uso de crioprotectores sobre la ultraestructura de ovocitos</i>	23
2.5. <i>Producción in vitro de embriones caprinos.</i>	24
2.5.1. <i>Evaluación de desarrollo embrionario.</i>	26
3. Objetivos.	29
3.1. <i>Objetivo general.</i>	29
3.2. <i>Objetivos particulares.</i>	29

4. Hipótesis.....	30
5. Metodología.....	31
5.1. <i>Etapa 1. Maduración in vitro de ovocitos caprinos.....</i>	<i>31</i>
5.1.1. <i>Colecta de ovarios.</i>	<i>31</i>
5.1.2. <i>Aspiración del líquido folicular.</i>	<i>31</i>
5.1.3. <i>Selección de ovocitos.....</i>	<i>31</i>
5.1.4 <i>Maduración de ovocitos.....</i>	<i>32</i>
5.2. <i>Etapa 2. Vitrificación de ovocitos.</i>	<i>33</i>
5.2.1 <i>Vitrificación de ovocitos.....</i>	<i>33</i>
5.2.2. <i>Calentamiento de los ovocitos.</i>	<i>33</i>
5.2.3. <i>Evaluación de la ultraestructura del ovocito. Técnica de inmunohistoquímica para ovocitos.....</i>	<i>34</i>
5.3. <i>Etapa 3: Producción de embriones in vitro a partir de ovocitos calentados.....</i>	<i>35</i>
5.3.1. <i>Capacitación espermática.</i>	<i>35</i>
5.3.2. <i>Fertilización In Vitro.....</i>	<i>35</i>
5.3.3. <i>Desarrollo Embrionario.</i>	<i>36</i>
5.3.4. <i>Evaluación de la calidad Embrionaria.</i>	<i>36</i>
5.4. <i>Análisis Estadístico</i>	<i>36</i>
6. Resultados	37
6.1. <i>Maduración In Vitro de ovocitos caprinos</i>	<i>37</i>
6.2. <i>Evaluación de la ultraestructura del ovocito. Técnica de inmunohistoquímica para ovocitos.....</i>	<i>39</i>
6.3. <i>Fertilización y desarrollo embrionario a partir de ovocitos vitrificados.....</i>	<i>42</i>
7. Discusión.....	43
8. Conclusión.....	49
9. Bibliografía	51
ANEXO I. PREPARACIÓN y SUPLEMENTACION DE MEDIOS.....	67
ANEXO II. TRABAJOS GENERADOS A PARTIR DE ESTA TESIS.	70

Lista de tablas.

Tabla 1. Evaluación de la maduración de ovocitos caprinos, madurados <i>in vitro</i> y expuestos a crioprotectores y vitrificados en cryotop.....	38
Tabla 2. Análisis de la distribución de cromosomas y la estructura y configuración de microtúbulos de ovocitos caprinos, madurados <i>in vitro</i> y expuestos a crioprotectores y vitrificados en cryotop.....	39
Tabla 3. Efecto de la exposición del crioprotector y de la vitrificación de ovocitos caprinos madurados <i>in vitro</i> sobre el desarrollo de embriones.....	42

Lista de Figuras.

Figura 1. Foliculogénesis, desde la formación de células germinales primordiales (FCGP) a la transición de un folículo primordial a un folículo antral.....	7
Figura 2. Dinámica folicular: Selección, crecimiento y dominancia de las ondas foliculares en bovino.....	10
Figura 3. Diferentes tipos de soporte utilizados para la vitrificación de ovocitos y embriones; a) Pajilla convencional de 0.25 mL, b) OPS (Open Pull Straw), c) Cryoloop, d) Pajilla biselada, e) Cryotop. En los círculos y aumentos se muestra como se colocan las células en cada uno de los soportes.....	20
Figura 4a. a) Ovocitos en Metafase I, b) y c) Ovocito en Metafase II (MII, Cuerpo polar (pb)).....	37
Figura 4b. Diferentes estadios de la meiosis, visualización de cromosomas y morfología del huso cromosómico en ovocitos caprinos madurados <i>in vitro</i>	38
Figura 5. Distribución de cromosomas y conformación de microtúbulos	41

Figura 6. Evaluación del desarrollo embrionario a partir de ovocitos caprinos. Se muestran los diferentes estadios de evaluación embrionaria..... 42

Abreviaturas y siglas usadas

PIVE. Producción *in vitro* de embriones.

COC´s. Complejo Cúmulo Ovocitos.

MIV. Maduración *in vitro*.

MM. Medio de Maduración.

TCM 199. Tissue Culture Medium 199

BSA. Albúmina Sérica Bovina

FSH. Hormona Folículo Estimulante.

LH. Hormona Luteinizante.

h. Horas.

CO₂. Dioxido de Carbono.

CPA´s. Crioprotectores.

Exp. Expuestos sin vitrificar.

NL. Nitrógeno Líquido.

EG. Etilen Glicol

DMSO. Dimetil Sulfoxido

hpf. Horas pos fecundación.

dpf. Días pos fecundación.

ART. Tecnologías de reproducción asistida.

IA. Inseminación Artificial

MOET. Multiovulación y Transferencia de Embriones.

CGP. Células Germinales Primordiales.

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

Fig. Figura.

OMI. Sustancia Inhibidora de la Maduración.

VG. Vesícula Germinal.

ARN. Ácido ribonucleico.

TGF. Factor de Crecimiento transformante.

BMP. Proteínas morfogénicas óseas.

IGF1. Factor de Crecimiento parecido a la Insulina 1

EGF. Factor de Crecimiento Epidérmico.

E2. Estrógenos.

GnRH. Hormona Liberadora de Gonadotropinas.

3 β -HSD. 3beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

FPM. Factor Promotor de la Maduración.

PKA. Protein Kinasa.

AMPc. Adenosim Mono Fosfato cíclico.

MAPK. Proteína kinasa activada por mitógenos.

ZP. Zona Pelucida.

MTT. Metil Tiazolil Tetrazolio.

SVV. Vitrificación en Superficie Sólida.

OPS. Open Pull Straw.

PROH. Propanodiol.

PVP. Polivinilpirrolidona.

PBS. Solución Buferada de Fosfatos.

SSF. Solución Salina Fisiológica.

LH. Hormona Luteinizante

EGS. Suero de cabra en estro

FF. Fluído Folicular

SOF. Fluído Oviductal Sintético.

TALP. Tyrode, Albúmina, Lactato y Piruvato.

mDM. Medio Definido Modificado.

GOEC. Células Epiteliales de Oviducto Caprino.

IETS. International Embryo Transfer Society.

MB. Medio Base

SE. Solución de Equilibrio

MV. Medio de vitrificación.

MF. Medio de Fertilización.

MCE. Medio de Cultivo Embrionario.

ANOVA. Analisis de Varianza.

1. Introducción.

Durante los últimos años las tecnologías de reproducción asistida (ART) han sido desarrolladas para aumentar la calidad y cantidad de descendencia de especies genéticamente superiores de animales domésticos. La inseminación artificial (IA), sincronización del estro, IA a tiempo fijo, crioconservación de gametos y embriones, la ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET), la PIVE, la determinación del sexo de los espermatozoides o embriones, y la transferencia nuclear son tecnologías que se utilizan para mejorar la eficiencia de producción de las especies utilizadas para la producción de alimentos (Smith *et al.*, 2018, Lamb y DiLorenzo, 2014).

En México la multiplicación del ganado para abasto aún se produce por técnicas reproductivas tradicionales, como la monta natural por empadre continuo y limitado uso de la IA. Estas técnicas tienen desventajas importantes que limitan la producción masiva y la comercialización de individuos genéticamente superiores que puedan producir mayores cantidades de carne y leche en forma más eficiente. En las últimas décadas se han logrado avances que permiten una mejor comprensión y eficiencia en el control y manipulación de los eventos reproductivos. Las ART como la IA, la superovulación y transferencia de embriones, se utilizan para aumentar la eficiencia reproductiva y acelerar el mejoramiento genético. Entre las ART más actuales, destacan la producción *in vitro* de embriones (PIVE) y la criopreservación (CP) de embriones y ovocitos.

Con la PIVE se puede obtener descendencia de hembras que con las técnicas *in vivo* no eran candidatas, como son hembras prepúberes, gestantes o postmortem (Amiridis y Cseh., 2012, Cognié *et al.*, 2003, Baldassarre *et al.*, 2002, Koeman *et al.*, 2003, Martino *et al.*, 1996). Además, la capacidad para criopreservar ovocitos y embriones de mamíferos se ha convertido en una parte integral de estas tecnologías, tanto en la medicina humana como en la veterinaria. La PIVE y CP se realizan actualmente en humanos, ovinos, porcinos y bovinos, con resultados satisfactorios (Leibo, 2008).

En nuestro país se han logrado avances importantes por medio de la PIVE y transferencia embrionaria en algunas especies animales, logrando el nacimiento de crías

vivas de bovinos (Romo *et al.*, 1997), porcinos (Ducolomb *et al.*, 2005) y ovinos (Pichardo *et al.*, 2016). Sin embargo, en caprinos la PIVE y otras ARTs se encuentra aún en fase de investigación y presenta un gran número de dificultades prácticas y técnicas, hasta ahora no se han reportado avances alentadores en esta especie ni intentos de obtención de crías a partir del uso de ovocitos vitrificados para producir embriones *in vitro*. Con la refinación, aplicación e implementación de estas técnicas obtendríamos ventajas importantes que permitan un mayor avance genético, acortar los intervalos generacionales y multiplicar la población genéticamente superior.

Desde el punto de vista de la aplicación comercial, las biotecnologías como la PIVE van de la mano con la CP de gametos y embriones. Al desarrollarse una técnica que permita en forma satisfactoria la CP de ovocitos y embriones producidos *in vitro* se contribuirá a una mejor y más abundante comercialización (compra-venta, importación-exportación), transporte y uso de embriones, lo que a la vez incrementaría la cantidad de individuos de calidad genética superior, de una especie tan importante para la producción alimentaria en México, que no ha recibido la atención que requiere lo que representa una importante aplicación potencial para la especie caprina y otras especies animales. Por otra parte, en los últimos años, en humanos ha tenido un surgimiento significativo el potencial benéfico de la criopreservación de ovocitos, en parte debido a que la vitrificación de ovocitos ofrece una alternativa para resolver la infertilidad femenina como un recurso para disponer de gametos femeninos disponibles para fertilización *in vitro*, mejorando su aplicación en pacientes oncológicas que recibirán tratamientos gonadotóxicos, radiológicos o quimioterapia, aquellas que han recibido cirugía repetida en el ovario como en la endometriosis entre otras.

La criopreservación se lleva a cabo mediante dos técnicas principales, congelación lenta y vitrificación. De éstas la vitrificación actualmente se ha vuelto la más popular ya que produce menor daño a las células. Sin embargo existe limitada información del daño directo a los ovocitos debido al gran tamaño de esta célula, la alta relación volumen/área de superficie y la baja permeabilidad de la membrana de estos (Gu *et al.*, 2020).

Es por ello que actualmente ha surgido el interés por investigar, mejorar y aplicar la vitrificación en especies de interés productivo e incluso en aquellas en peligro de extinción con el fin de conservar exitosamente gametos de estas especies en bancos de germoplasma y así conservar esta genética. Es por ello que el objetivo de éste estudio fue producir embriones caprinos *in vitro* a partir de ovocitos vitrificados madurados *in vitro* con la calidad y viabilidad suficiente para ser transferidos.

2. Revisión bibliográfica.

2.1. Fisiología del ovocito.

El ovocito es el regulador central de múltiples aspectos de la fertilidad femenina, incluido el desarrollo folicular y la embriogénesis temprana. Durante su detención prolongada del diploteno, el ovocito se somete a fuentes endógenas de factores que inducen daños, como especies reactivas de oxígeno del metabolismo, y exógenas como, estrés por calor o desnutrición, entre otros, lo que puede conducir a un deterioro progresivo de la calidad de los ovocitos. Una competencia deficiente en el ovocito puede llevar no solo a una falla de la fertilización, sino también a una menor tasa de desarrollo después de la fertilización (Moussa *et al.*, 2015).

En los mamíferos el tamaño promedio del ovocito es de 100-120 μm . Su citoplasma contiene reservas nutritivas como lípidos, proteínas y polisacáridos. Se encuentra rodeado por una matriz extracelular especie-específica, que lo protege contra daños físicos llamada zona pelúcida, y un grupo de células histofisiológicamente igual a las células foliculares llamadas células de la granulosa (Muñoz, 2008).

El desarrollo folicular y de los ovocitos en la mayoría de los mamíferos comienza durante la vida fetal. Durante la sexta semana de desarrollo se observa un grupo de “células madre”, son las células germinales primordiales (CGP) las cuales tienen la capacidad inductora gonadal, las CGP se diferencian a ovogonias y estas proliferan por mitosis dentro de la gónada primitiva, al término de este sobreviene un periodo de síntesis de ADN, en este estadio la ovogonia se transforma en ovocito primario (Fair, 2003, Fernández, 2012). Durante este desarrollo ovárico, las células germinales se encierran

progresivamente dentro de estructuras epiteliales denominadas “cordones ovígeros” constituidos por células pregranulosas, revestidas por una membrana basal. Al final del desarrollo ovárico, estos cordones se fragmentan en folículos primordiales, que son unidades constituidas por un ovocito primario rodeado por una sola capa de células de la granulosa Figura 1 (Fig.1) (Sánchez y Smitz, 2012, Guigon y Cohen, 2011, Juengel *et al.*, 2002).

Los factores que regulan la formación de folículos primordiales no están bien conocidos aún. Hormonas como el 17- β estradiol, factores de crecimiento y citoquinas son reguladores clave en la fisiología ovárica, particularmente en relación con la foliculogénesis y ovulación donde contribuyen a crear un ambiente de apoyo para la selección y crecimiento folicular (Field *et al.*, 2014, Garverick *et al.*, 2010).

Los ovocitos primarios inician su primera división meiótica, la cual comprende los estadios profase, metafase, anafase y telofase, a su vez la profase I se puede dividir en cinco periodos transitorios que se identifican con los nombres de: preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno, y diploteno (Fair, 2003). Los ovocitos primarios que progresan a su primera profase meiótica, no la culminan ya que se detienen en el periodo de diploteno, en el cual permanecen desde el nacimiento hasta la pubertad. La permanencia en este largo periodo es debida a la presencia de la sustancia inhibidora de la maduración (OMI) secretada por las células foliculares (Sadler, 2001).

El núcleo del ovocito en ésta etapa se conoce como vesícula germinal VG y se caracteriza porque el huso mitótico no está formado y la envoltura nuclear está intacta. En este momento se induce una transcripción activa que permite que los ovocitos primarios acumulen ARN mensajeros que serán requeridos durante su desarrollo posterior (Muñoz, 2008).

Al nacimiento los ovarios de las hembras en todas las especies contienen una infinidad de ovocitos primarios, cada ovocito está rodeado por una sola capa formada de 4-8 células foliculares y lámina basal intacta, estos forman la primera categoría de folículos, los folículos primordiales. Cada ovocito y las células que lo rodea, tienen un sistema de comunicación muy estrecha mediante uniones gap que facilita la transferencia de

señales, nutrientes, hormonas, entre otras sustancias dentro y fuera del ovocito y entre las células foliculares (Fair, 2003).

2.2. Foliculogénesis

Los factores que regulan la formación de folículos primordiales no están bien conocidos aún. El rol de un receptor c-kit y su ligando ha tenido una considerable atención en el desarrollo ovárico, pues se ha encontrado en forma abundante en células germinales gonadales femeninas de ratón, pero está ausente una vez que inicia la meiosis y vuelve a detectarse cuando el ovocito entra en estado de diploteno durante la profase de la primera meiosis. Otros factores que se han encontrado durante en la formación folicular son miembros de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF), como por ejemplo proteínas morfogenéticas oseas (BMPs) y miembros de la familia de proto oncogénesis de linfoma de células B/ leucemia 2(bcl2), IGF1, BMP, EGF (Fair, 2003, Webb *et al.*, 2003).

2.2.1. La transición del folículo primordial al folículo primario

La foliculogénesis se inicia con los ovocitos arrestados en profase I y rodeados por una capa de células epiteliales planas, al cual se denomina folículo primordial (Sadler, 2001). Estos folículos comienzan su período de crecimiento por mecanismos intraováricos independientes de las gonadotropinas (Webb *et al.*, 2003). El ovocito primario comienza a crecer y las células foliculares cambian de forma plana a cúbica, para proliferar luego en varias capas formando un epitelio estratificado de células de la granulosa. Tanto el ovocito como las células de la granulosa secretan glicoproteínas para formar la zona pelúcida. Estas características definen al folículo primario. A medida que avanza el desarrollo, aumenta el número de células de la granulosa y aumentan las proyecciones citoplasmáticas de las células de la granulosa que harán contacto con el ovocito, transformándose así el folículo primario en secundario (Muñoz, 2008, Hafez y Hafez, 2000).

2.2.2. Desarrollo del folículo antral.

El folículo antral, cavitario o terciario es influenciado por la Hormona Foliculo Estimulante (FSH). Los espacios intercelulares de las células de la granulosa ocupados

por líquido, confluyen y forman el antro folicular. Las células de la granulosa se organizan y forman las células del cúmulo oóforo, cuya primera capa se llama corona radiada. Las células del estroma circundante forman la teca folicular compuesta por dos capas, una teca interna de células secretorias que es invadida por una red capilar y la cual aporta los nutrientes tanto para el ovocito como para las células de la granulosa, y una teca externa de tejido conectivo con células similares a fibroblastos (Baker, 1982; Sadler, 2001).

Las células de la granulosa y de la teca interna tienen un comportamiento diferente ante la presencia gonadotrópica. La producción estrogénica (E2) es asumida solamente por las células de la granulosa, a partir de la influencia de la FSH sobre sus receptores desarrollados en la fase de folículo antral. En la teca interna no se desarrollan los receptores para la gonadotropina FSH, por lo tanto no tiene la capacidad de producir E2, mientras que sí posee receptores para la LH. Su producción esteroidea es androgénica, siendo transformados en E2 a nivel de las células de la granulosa (Muñoz, 2008).

Los folículos antrales tienen otras producciones de carácter hormonal como las inhibinas y las activinas. Las inhibinas son hormonas de la familia peptídica que pueden controlar la liberación de la FSH, inhibiendo la respuesta a GnRH. Están formadas por dos cadenas de naturaleza peptídica y unida por enlaces de sulfuro y con las variantes A y B. Las combinaciones de las cadenas dan lugar a las activinas, las cuales constituyen el verdadero factor de liberación de la FSH. Ambas hormonas se han encontrado disueltas en el líquido folicular de los folículos antrales de diferentes especies animales. Las proteínas inhibina, activina y folistatina se aislaron de las gónadas por su capacidad para modular la secreción de FSH hipofisaria. La activina estimula la FSH, mientras que la inhibina y la folistatina son inhibitorias (Lin *et al.*, 2003).

La FSH estimula las tasas de crecimiento de folículos pre-antrales, y puede tomar 3 meses para que un folículo primordial alcance la etapa ovulatoria. El desarrollo de folículos de ovejas y vacas a partir de 2 y 4 mm de diámetro respectivamente inician su dependencia a gonadotropinas (Ginther, 1993).

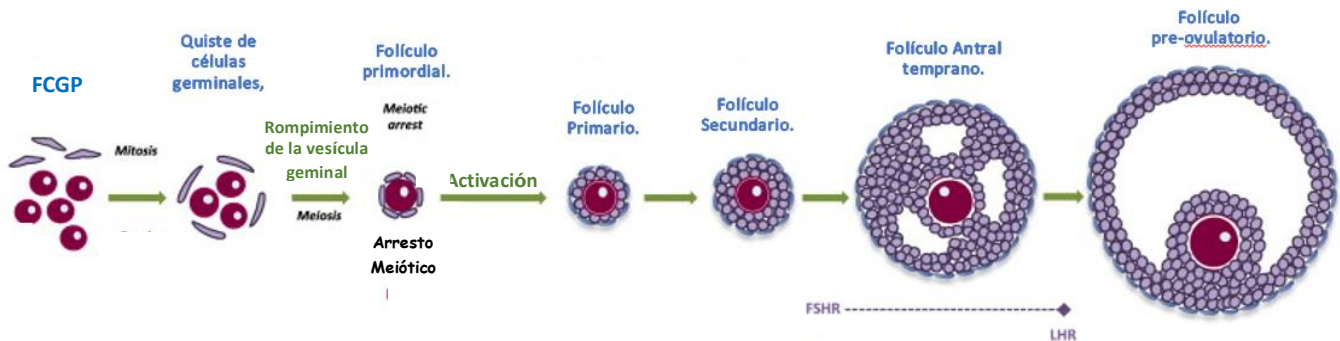


Fig 1. Foliculogénesis, desde la formación de células germinales primordiales (FCGP) a la transición de un folículo primordial a un folículo antral. Adaptado de Sánchez y Smitz (2012).

2.2.3. Dinámica folicular: Selección, crecimiento y dominancia de las ondas foliculares.

La fertilidad en mamíferos depende de que la hembra tenga un adecuado pool de folículos primordiales para suministrar ovocitos para la fertilización (Nilsson y Skyner, 2009). La dinámica folicular se caracteriza por una serie de ondas de crecimiento folicular coordinadas, que ocurren de 2 a 3 veces durante un ciclo ovárico en donde una cierta cantidad de folículos primordiales activan su crecimiento, se desarrollan y solo algunos de ellos maduran, mientras los demás de ellos experimentan un proceso de atresia fisiológica (Fig.2). Las ondas foliculares son comunes en la mayoría de las especies monovulares, como bovinos, caprinos, ovinos, equinos e incluso humanos (Homem *et al.*, 2010, Ben y Ginther, 2006, Ginther, 1993). Estas especies desarrollan una onda folicular ovulatoria, generalmente durante la fase folicular o estrogénica del ciclo y ondas foliculares menores o anovulatorias, durante la fase luteínica o progestacional. Las ondas foliculares menores se caracterizan por presentar un folículo antral que no alcanza el diámetro de un folículo dominante (Homem *et al.*, 2010, Baerwald *et al.*, 2003). En el momento de la pubertad, en el caso particular de la vaca, entre 8 a 15 folículos

primordiales maduran con cada ciclo ovárico, de los cuales se produce la muerte de por lo menos 12 folículos por un proceso de atresia (Muñoz, 2008, Campo *et al.*, 2003). En yeguas se han reportado alrededor de 6 folículos primordiales reclutados, pero éstos resultados pueden variar en cada onda (Homem *et al.*, 2010).

Durante el ciclo estral un aumento en la FSH circulante procede al reclutamiento de un grupo de folículos. La FSH promueve el principal impulso para el reclutamiento folicular, la amplificación de su efecto está dado por la IGF y sus proteínas de enlace, el diámetro de los folículos reclutados es de 4-5 mm y la cantidad va de 5 a 15 dependiendo del momento en que inicie esta onda (Muñoz, 2008, Webb *et al.* 2003). Los folículos reclutados se caracterizan por la inducción de la expresión de ARNm que codifican una gama de enzimas esteroidogénicas, receptores de gonadotropinas y factores reguladores locales (Webb *et al.*, 2003, Webb *et al.*, 1999).

Posteriormente los folículos más desarrollados bloquean el desarrollo de los restantes. Este efecto se produce a través de sustancias hormonales como las inhibinas y el estradiol, las cuales actúan disminuyendo la liberación de FSH. Los niveles insuficientes de gonadotropinas afectan el desarrollo de los folículos más pequeños. Así mismo, en esta fase de selección los factores paracrinos, como la producción de EGF, reducen la capacidad de los folículos pequeños para utilizar los andrógenos (Campo *et al.*, 2003). La selección de los folículos dominantes en equinos ocurre a partir de los 10 mm y excede el diámetro de los folículos subordinados por 2 mm (Ginther *et al.*, 2004, Ginther, 1993).

Un folículo dominante o estrogenoactivo produce mucho más estrógeno que los subordinados y tienen mayor número de receptores tanto de LH como de FSH. Este incremento en el número de receptores de FSH, le permite seguir creciendo mientras que los folículos subordinados sucumben con estos bajos niveles (Muñoz, 2008). A medida que los folículos continúan madurando, hay una transferencia de dependencia de FSH a LH, que puede ser parte del mecanismo involucrado en la selección de folículos para un crecimiento continuo. La LH es requerida para el continuo desarrollo de folículos hasta el estado preovulatorio (Webb *et al.* 2003). Los ovocitos reanudan la meiosis a partir de folículos dominantes de 15 mm de diámetro en bovinos y 22.5 mm en equinos (Ginther

et al., 2004, Ginther, 1993). Los ovocitos van creciendo de 4 a 15 mm en aproximadamente 5 días. El diámetro del folículo preovulatorio del folículo dominante llega a medir entre 16 -20 mm en bovinos y 40 - 45mm en yeguas un día antes de la ovulación en una onda folicular ovulatoria (Ben y Ginther, 2006, Ali *et al.*, 2004, Ginther *et al.*, 2004). El mecanismo de selección del folículo dominante u ovulatorio parece estar ligado a la expresión de un ARNm que codifica LHr y 3beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), así como la transcripción de enzimas como la P450scc y P450arom en las células de la granulosa indispensables para la esteroidogénesis folicular (Baerwald *et al.*, 2003, Webb *et al.*, 2003, Webb *et al.*, 1999). Localmente se producen factores de crecimiento, como factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGFs), TGF- β , inhibinas, activinas y BMPs, que trabajan en conjunto con las gonadotropinas en un continuo crecimiento folicular (Fig.1) (Webb *et al.*, 2003, Webb *et al.*, 1999).

En un ciclo sexual fisiológico, el factor fundamental que determina el destino del folículo dominante (ovulación o atresia) es el nivel de progesterona cuando este folículo finaliza su fase de crecimiento. De esta manera, cuando los niveles de progesterona son elevados (fase luteínica del ciclo) se produce la regresión o atresia del folículo dominante (Muñoz, 2008). El mecanismo de selección de folículos dominantes aún requiere esclarecimiento. La integración de todas estas señales endócrinas e intraováricas determinan cuantos folículos inician su crecimiento y cuál de ellos continua su desarrollo hasta convertirse en un folículo dominante o se desvían hacia vías apoptóticas que conducen a la atresia (Webb *et al.*, 1999).

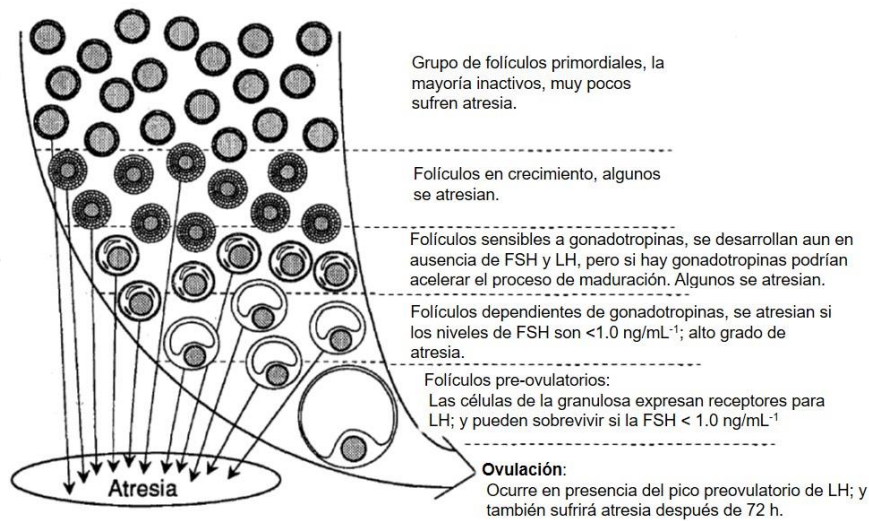


Fig.2 Dinámica folicular: Selección, crecimiento y dominancia de las ondas foliculares en bovino. Adaptada de Scaramuzzi (2011).

2.2.4. Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito.

Como se mencionó antes, los ovocitos de mamíferos después del nacimiento y hasta la pubertad se encuentran detenidos durante meses o años en profase I de la primera división meiótica. Durante éste periodo el ovocito acumula ARNm, proteínas, lípidos y azúcares, mientras gradualmente va incrementando su tamaño. La acumulación de éstas fuentes de energía e información son de esencial importancia para el paso final de la ovogénesis: la maduración del ovocito (Catalá, 2012).

La maduración del ovocito implica el reinicio de la meiosis I y la progresión hacia el estadio de metafase II (maduración nuclear) y una serie de sucesos citoplasmáticos (morfológicos, funcionales y bioquímicos) necesarios para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Eppig.,1993). La secuencia correcta de estos eventos es muy importante ya que la habilidad del ovocito para ser fertilizado y desarrollarse normalmente depende tanto de la maduración nuclear como citoplasmática (Hurtt *et al.*, 2000).

La maduración citoplásmica, comprende los cambios ultraestructurales que ocurren en el ovocito durante el crecimiento folicular desde el estadio de VG hasta MII (Ducibella *et*

al., 1994; Shamsuddin, 1993). Estos cambios ultraestructurales incluyen la migración de la VG cerca de la zona pelúcida, la síntesis y acumulación de los diferentes tipos de RNA, ribosomas y polipéptidos (Withaker, 1996), localización de las mitocondrias en la periferia del ovocito, aumento en el número de aparatos de Golgi y en los niveles de glutatión, translocación de los gránulos corticales desde el centro del ovocito hacia la periferia y su unión a la membrana plasmática (Fair *et al.*, 1997).

Durante el crecimiento folicular el ovocito adquiere la competencia meiótica, la cual se refiere a la capacidad del ovocito para completar el ciclo meiótico o maduración nuclear. Esta es adquirida progresivamente durante el crecimiento folicular y está estrechamente relacionada con el tamaño del ovocito (110 μm) y éste a su vez con el tamaño del folículo (2 a 3 mm) (Fair *et al.*, 1997; Fair *et al.*, 2001).

El ovocito que se encontraba detenido en profase de la meiosis I, desde la vida embrionaria hasta que se da el pico preovulatorio de FSH y LH y en respuesta a éste, la meiosis continúa hasta metafase II, estadio en el que ocurre el segundo arresto meiótico. Como consecuencia el folículo expulsa un ovocito completamente maduro (ovulación) y apto para ser fecundado (Withaker, 1996).

La meiosis es regulada por el Factor Promotor de la Maduración (FPM). Éste regulador es una proteína heterodimérica compuesta de dos subunidades, la subunidad catalítica p34cdc2 y la subunidad reguladora ciclina B1. La asociación de estas dos subunidades es requerida para la activación de la actividad de la protein cinasa (PKA) (Catalá, 2012).

En el bloqueo meiótico, el ovocito está detenido en profase I (estadio VG) debido al efecto inhibitorio de la PKA mediado por el AMPc. Esta inhibición es realizada en dos niveles: Evitando la activación del pre-Factor Promotor de la Maduración (pre-FPM) por la fosforilación de p34cdc2 y reprimiendo la síntesis de ciclina B1. Después de la liberación del ovocito del folículo ovárico, las concentraciones de AMPc intraovocito disminuyen y el pre-FPM se activa. La poliadenilación del RNAm de Mos es posterior a la activación del FPM, conduciendo a la expresión de Mos y la activación de proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK) (Fair, 2003). Se ha encontrado que los ovocitos

caprinos incompetentes tienen una muy limitada cantidad de ciclina B1 y p34cdc2 (Catalá, 2012).

La inactivación de FPM en metafase I (MI) es necesaria para la expulsión del primer cuerpo polar, mientras que su reactivación al inicio de la segunda división meiótica evita la entrada a interfase. El bloqueo del ovocito en metafase II es mantenido hasta la fertilización por la acción de las MAPK y el FPM (Josefsberg *et al.*, 2003). El ovocito reiniciará la Meiosis II, solamente si es fecundado por el espermatozoide (Figuereido *et al.*, 2002).

El proceso de reactivación de la meiosis involucra la desintegración de la envoltura nuclear de la VG (BDVG), condensación de cromosomas, formación del huso en metafase I, separación de cromosomas homólogos con expulsión del primer cuerpo polar y freno en metafase II (Fair *et al.*, 1997; Kubelka *et al.*, 1998; Salomone *et al.*, 2001).

El crecimiento del ovocito es un factor determinante para la maduración. Los ovocitos pequeños no tienen la habilidad para madurar debido a la imposibilidad para activar la Cdc2 cinasa y la cascada de las MAPcinasas, indispensables para la maduración (Miyano y Manabe, 2007). Tan pronto como madura el folículo y se produce el pico preovulatorio de LH, el ovocito contenido en el folículo preovulatorio reiniciará su meiosis I, dando lugar a dos células con diferente cantidad citoplasmática pero con la misma carga de cromosomas dobles. Una de estas células, será el ovocito secundario y la otra el primer cuerpo polar, el cual permite reducir el número cromosómico sin comprometer los componentes citoplasmáticos importantes para el ovocito.

El cuerpo polar es expulsado por la región libre de los gránulos corticales del ovocito, una zona donde se ha descrito una disminución de las vellosidades del oolema y donde se sugiere que no hay receptores ni de unión ni de fusión para los espermatozoides (Wassarman y Albertini, 1994). Antes del estado de latencia nuclear e inmediatamente de culminar la meiosis I, se inicia la meiosis II, para detenerse nuevamente en el periodo de metafase II. En esta fase se produce la ovulación en la mayoría de los mamíferos y solo si el ovocito es fecundado o activado artificialmente, retomará su meiosis y se

transformará en óvulo, de lo contrario, en aproximadamente 24 horas luego de la ovulación degenera (Buccione *et al.*, 1990; Riviera, 1992).

Después de la ovulación, el ácido hialurónico liberado por las células del cúmulo produce la ruptura de las uniones comunicantes, lo que provoca una dispersión de las células de la granulosa en una matriz viscosa. Se ha sugerido también que el ovocito sea responsable de secretar un factor que induce la expansión de las células del cúmulo (Eppig, 1991).

Desde el inicio del desarrollo ovocitario y folicular, las células de la granulosa y el ovocito secretan glicoproteínas que se depositan entre la membrana plasmática y las células del cúmulo, y formaran una matriz externa conocida como zona pelúcida (ZP).

La importancia de la interacción de las células foliculares somáticas con el ovocito (complejo cumulus-ovocito) se relaciona con el control fisiológico de algunos pasos que comprometen a la ovogénesis, entre los cuales se encuentra el crecimiento del ovocito, la progresión de la maduración meiótica y la formación y maduración de la zona pelúcida. La integridad de estas uniones es necesarias para la maduración de un ovocito competente, dentro de las cuales se han visualizado cerca de 858 proteínas expresadas tanto en las células del cúmulo como en el ovocito (Memili *et al.*, 2007).

En condiciones *in vivo* el reinicio de la meiosis ocurre después de un pico preovulatorio de la hormona LH durante el estro, y momentos antes de la ovulación se observan modificaciones citoplasmáticas. En este mecanismo se encuentran involucradas una serie de modificaciones en número, tamaño, posición de organelos como la migración periférica de los gránulos corticales, así como de síntesis de diferentes proteínas (Suss *et al.*, 1988). Solo el ovocito completamente desarrollado puede reanudar la meiosis, lo que implica que los cambios citoplásmicos que ocurrieron antes de la maduración sean esenciales para la adquisición de la capacidad de desarrollar un embrión (Catalá, 2012).

Por lo contrario, en los procedimientos de fertilización *in vitro*, el proceso de meiosis se retoma espontáneamente como consecuencia de la aspiración del ovocito (Mayes y Sirard, 2001; Goncalves *et al.*, 2002). Los ovocitos que no tienen una sincronía entre la

maduración nuclear y la maduración citoplasmática no serán fecundados, o bien, su desarrollo embrionario no llegará a término (Blondin y Sirard, 1995).

2.3. Evaluación de la maduración y viabilidad de ovocitos.

En la actualidad existen numerosas pruebas para determinación *in vitro* de la viabilidad celular, y así predecir el éxito de la PIVE así como para la evaluación de la citotoxicidad de algún medio en específico utilizado en diversos experimentos. La prueba del Bromuro de Metil Tiazolil Tetrazolio (MTT) es altamente utilizada por su facilidad, rapidez y bajo costo. Está clasificada dentro de las tinciones para evaluar funcionalidad de las células, mide viabilidad, proliferación, citotoxicidad y actividad citostática en base a la actividad celular de enzimas oxido reductasas dependientes de NAD. Permite obtener en menor tiempo y costo resultados fiables (Rodríguez, 1997)

El MTT es una sal de color amarillo y soluble en agua. La prueba se basa en la reducción metabólica del Bromuro de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, actúa produciendo una destrucción del anillo tetrazolio, formando cristales purpuras insolubles (formazán), que posteriormente se pueden medir por espectrofotometría y de forma visual por medio de microscopía óptica, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Castro, 2006., Mosmann, 1983).

La evaluación de la viabilidad y la maduración se pueden realizar en el mismo ovocito mediante una técnica de doble tinción utilizando MTT para determinar la actividad mitocondrial en los ovocitos vivos y una tinción fluorescente llamada Bisbenzimidide (Hoechst 33258) para determinar la etapa de maduración (Teteltitla, 2014).

2.4. Criopreservación de ovocitos y embriones caprinos.

La capacidad para criopreservación ovocitos y embriones es crítica para la aplicación generalizada de las ART. La criopreservación de embriones y ovocitos obtenidos de animales de alto valor genético facilita la dispersión de genética superior, avanzando con ello en el mejoramiento genético (Amidiris *et al.*, 2012).

Los primeros éxitos de transferencia de embriones caprinos congelados fueron en 1976 (Bilton y Moore), ya que tradicionalmente, los embriones eran criopreservados utilizando bajas concentraciones de crioprotectores en técnicas de congelación lenta; sin embargo, este método da como resultado una reducción en la capacidad no sólo de establecer, sino de mantener la gestación (Lane *et al.*, 1999). Además, los crioprotectores, son muy tóxicos para los embriones y ovocitos, pero la toxicidad del crioprotector puede ser minimizada mediante el aumento de la velocidad de enfriamiento como sucede con la vitrificación.

La vitrificación de ovocitos inmaduros, maduros y embriones ha sido realizada en diferentes especies de mamíferos. Hasta ahora, muchos estudios han sido realizados para incrementar la tasa de supervivencia de los ovocitos y embriones para obtener crías vivas. La vitrificación de los ovocitos inmaduros es todavía un área muy amplia de investigación debido a que uno de los más grandes desafíos para los crio-biólogos reproductivos es establecer un procedimiento de vitrificación-calentamiento que permita tener un banco de ovocitos y el mejoramiento de las técnicas de reproducción asistida (Mullen y Fahy., 2012; Rojas *et al.*, 2004).

Para la crio-preservación de los ovocitos los principales factores que afectan la supervivencia son la fase nuclear de la célula, la viscosidad de los agentes crioprotectores (CPAs), volumen y tiempo de exposición, tasas de calentamiento-enfriamiento del dispositivo y la habilidad del embriólogo. Los ovocitos inmaduros son más sensibles que los ovocitos maduros o embriones (Somfai *et al.*, 2012). Este impacto es debido a los cambios estructurales en la membrana de los ovocitos de mamíferos a través de la maduración afectando la temperatura de transición de fase de lípidos de la membrana. Se sabe que la vitrificación de ovocitos inmaduros de ovinos no es tan difícil como la vitrificación de ovocitos inmaduros de porcinos (Fernández-Reyes *et al.*, 2012).

Muchos laboratorios actualmente están desarrollando técnicas para madurar ovocitos criopreservados de diferentes especies y fertilizarlos *in vitro* y de este modo producir embriones, los cuales pueden ya sea ser criopreservados o transferidos a hembras receptoras para llevar a término la gestación (Byrd *et al.*, 1997; Somfai *et al.*, 2010).

La vitrificación de ovocitos inmaduros y maduros ha sido realizada en diferentes especies con resultados variables (Somfai *et al.*, 2010; Fujihira, 2004; Diez *et al.*, 2005). Sin embargo todavía no se reconoce como un procedimiento bien establecido debido a sus limitantes y la falta de información con respecto a las características biológicas esenciales de los ovocitos después del calentamiento (Ledda *et al.*, 2007; Succu *et al.*, 2011). Para mejorar la viabilidad, maduración y desarrollo embrionario (DE), diferentes protocolos de vitrificación con una variedad de crio-protectores han sido realizados (Somfai *et al.*, 2010; Nagashima *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2010).

2.4.1. Diferencias entre congelación y vitrificación.

La vitrificación es un proceso que convierte al líquido en un estado sólido vítreo excluyendo la formación de cristales de hielo. En 1985, se realizó el primer estudio para lograr la criopreservación sin hielo mediante la vitrificación de células de mamíferos (Rall y Fahy, 1985).

Rall y Fahy (1985) fueron los primeros en reportar la vitrificación, como una solidificación similar al vidrio, por enfriamiento ultrarrápido en embriones de ratón, que muestra una alternativa a los métodos tradicionales de congelación para evitar daño por frío y la formación de cristales de hielo. La vitrificación se ha aplicado ampliamente para criopreservar ovocitos en otras especies de mamíferos incluyendo ganado bovino (Zhou *et al.*, 2010, Albarracin *et al.*, 2005, Vieira *et al.*, 2002, Vajta *et al.*, 2000, Martino *et al.*, 1996), cerdos (Gupta *et al.*, 2007, Cuello *et al.*, 2004, Isachenko *et al.*, 1998), ovejas (Moawad *et al.*, 2012, Silvestre *et al.*, 2006, Isachenko *et al.*, 2001), cabras (Begin *et al.*, 2003), caballos (Hurtt *et al.*, 2000), búfalo (Dhali *et al.*, 2000), gatos (Murakami *et al.*, 2004) y seres humanos (Kuwayama *et al.*, 2000).

La vitrificación reduce tiempo y costos e implica la adición de una mayor concentración de crioprotectores y a una velocidad de enfriamiento muy rápida (Rall y Fahy, 1985), que conduce a una solidificación similar al vidrio, en lugar de formación de cristales de hielo (Holtz, 2005). Los primeros intentos exitosos de congelación de embriones caprinos mediante la técnica de vitrificación tuvieron un éxito limitado (Yuswiati y Holtz, 1990) reportando un 57% de mórulas y 76% de blastocistos transferibles después de la

desvitrificación, con una supervivencia embrionaria del 22%. En una etapa posterior, Traldi *et al.* (1999) reportaron resultados más aceptables con la vitrificación de embriones caprinos con una supervivencia embrionaria *in vivo* e *in vitro* del 60 y 30% respectivamente y una tasa de nacimientos del 45%.

Los blastocistos parecen ser más adecuados para la criopreservación que las mórulas (Li *et al.*, 1990, Nowshari y Holtz 1995, Puls-Kleingeld *et al.*, 1992, Yuswiati y Holtz, 1990), aunque Le Gal *et al.*, (1993) y Li *et al.*, (1990) difieren en opinión y además el último menciona que los blastocitos caprinos que hayan eclosionado de la ZP también puede ser criopreservados exitosamente, lo cual parece ser sorprendente porque los blastocistos eclosionados carecen de la protección de una zona intacta, lo que se piensa es crítico para la supervivencia de embriones criopreservados (Nowshari y Holtz, 1993).

2.4.2. Técnicas de vitrificación de ovocitos y embriones.

El método de vitrificación, que se introdujo con el paso de los años y con el mejoramiento de las técnicas de reproducción asistida, es un método de ultracongelación que evita la formación de cristales, ya que no sólo disminuye potencialmente la temperatura, sino que además logra que un estado cristalino se convierta en estado vítreo (Rall y Fahy, 1985). Aun cuando en algunos países todavía es una técnica experimental, la vitrificación es un procedimiento de rutina en muchas partes del mundo. Trajo consigo múltiples beneficios, entre los cuales el más importante es poder vitrificar ovocitos (Kuleshova *et al.*, 1999; Liebermann *et al.*, 2002) con lo que la preservación de la fertilidad y la congelación de embriones, que en muchos países es muy restringida o está prohibida, están teniendo una nueva alternativa. Uno de los inconvenientes de la técnica es que requiere altas concentraciones de crioprotectores, cuya toxicidad daña a las células (Fahy *et al.*, 1987).

En general, los ovocitos son más susceptibles al daño por enfriamiento que los cigotos debido a que la integridad del microtúbulo de la metafase es dañada durante el enfriamiento y la alta concentración de crioprotectores afecta a los ovocitos durante el equilibrio. Además, las diferencias en las estructuras de membrana parecen hacer a los ovocitos más sensibles al enfriamiento en comparación con cigotos (Ghetler *et al.*, 2005).

Para vitrificar ovocitos y embriones se requiere incrementar la concentración de crioprotectores y esto aumenta su toxicidad, por lo que con los diferentes dispositivos se trata de disminuir el volumen de medio de vitrificación y de esta forma aumentar la velocidad de enfriamiento para que sea lo más rápido posible y el cambio de temperatura en la zona de transición no ocasione daño a los ovocitos y a los embriones, lo cual se logra cuando el volumen de la solución de vitrificación es mínimo (Cuello *et al.*, 2004). Así los nuevos métodos de vitrificación de células sensibles deberán maximizar la velocidad de enfriamiento, mantener la viabilidad de la muestra durante el proceso, evitar la tensión mecánica a la muestra, y proporcionar facilidad de manipulación durante la criopreservación y la recuperación (Lane *et al.*, 1999).

Aunque la toxicidad de los crioprotectores puede ser minimizada por el aumento de la velocidad de enfriamiento (Martino *et al.*, 1996), otros efectos secundarios de refrigeración y de crioprotectores tales como el endurecimiento zona y la activación partenogenética puede afectar los resultados de fertilización y causar bajas tasas de desarrollo a la etapa de blastocisto (Carroll *et al.*, 1990; Somfai *et al.*, 2007).

Para que la técnica sea efectiva, son indispensables la experiencia y la habilidad del embriólogo para poder garantizar la supervivencia, la viabilidad y la calidad del embrión. Otro factor determinante en la supervivencia del embrión es el soporte que se utilice.

Existen dos tipos de soportes principales: el abierto y el cerrado. En la práctica se utiliza el soporte abierto de Cryotop (Kitazato Ltd., Japón); y posteriormente se introdujo el Cryolock (BioTech, Inc., Canada). Ambos soportes son muy similares entre sí, el Cryotop tiene un filamento más delgado que el Cryolock, sin embargo, dicha diferencia no llega a afectar de manera significativa las tasas de supervivencia y de gestaciones cuando los embriones son calentados y transferidos a las pacientes. El uso del Cryolock también es recomendable para la vitrificación embrionaria (Lazcano *et al.*, 2010). La valoración del soporte es muy importante, ya que debe asegurarse la supervivencia y viabilidad del embrión.

Varios métodos se han desarrollado para lograr un enfriamiento rápido, reduciendo al mínimo el volumen de solución de vitrificación que contiene ovocitos y embriones, tales

como la vitrificación con rejillas de microscopía electrónica (Martino *et al.*, 1996), capilares de vidrio (Hochi *et al.*, 1994), open pulled straws (OPS) (Vajta *et al.*, 1998), Cryoloops (Lane *et al.*, 1999), Cryotops (Kuwayama *et al.*, 2000) y la vitrificación en superficie sólida (SSV) (Dinnyés *et al.*, 2000). Estos métodos difieren en la composición de los crioprotectores y el régimen de tratamiento y también en los métodos para el enfriamiento y el almacenamiento de las muestras conservadas. En la Fig 3. se puede observar algunos de los soportes o dispositivos comúnmente utilizados en la vitrificación de ovocitos y embriones.

Los dispositivos para vitrificación como el Cryotop, permiten utilizar un volumen de medio de vitrificación menor a 0.1 μ L, este se considera altamente eficiente debido a la velocidad de enfriamiento aumentando con esto la supervivencia embrionaria, comparado con otros como el Open Pulled Straw (OPS) (Kuwayama, 2007); por ello el Cryotop ha sido probado para la vitrificación de embriones en humanos (Kuwayama, 2007, Lazcano *et al.*, 2010) y bovinos (De Rosa *et al.*, 2007) así como para la vitrificación de ovocitos de ovinos (Fernández, 2012), bovinos (Sripunya *et al.*, 2010), y Bufala (Gasparrini *et al.*, 2007).

Un procedimiento que resulta en un éxito prometedor con un nuevo método de vitrificación es la SSV la cual utiliza una superficie metálica pre-congelada. Este método combina las ventajas de vitrificación sin contenedor en microgotas y el aumento del intercambio de calor de una superficie de metal frío. Además, una superficie metálica limpia facilita el manejo estéril de las gotas. Por otra parte, la preservación de las razas de ganado en peligro de extinción podría ser facilitada por el almacenamiento criogénico exitoso de los ovocitos (Dinnyés *et al.*, 2000).

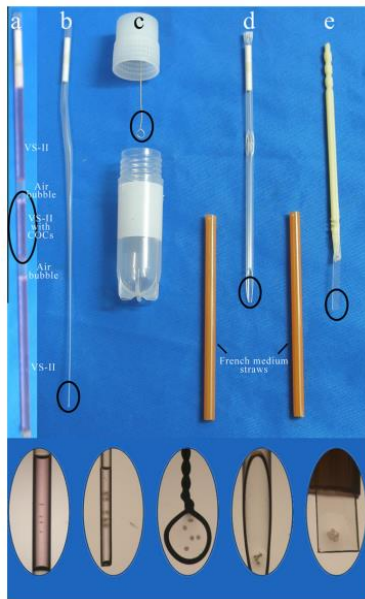


Fig 3. Diferentes tipos de soporte utilizados para la vitrificación de ovocitos y embriones; a) Pajilla convencional de 0.25 mL, b) OPS (Open Pull Straw), c) Cryoloop, d) Pajilla biselada, e) Cryotop. En los círculos y aumentos se muestra como se colocan las células en cada uno de los soportes. Tomado de Rao *et al.*, 2012.

Según Begin *et al.* en 2003, los porcentajes de división y blastocistos producidos a través de ovocitos vitrificados caprinos cuando se utiliza el método de SSV han sido alentadores, ya que no hay diferencia en el desarrollo de embriones producidos con ovocitos frescos, demostrando los bajos efectos citotóxicos del CPA; método que además requiere el mínimo de equipo, por lo que los costos son reducidos.

El éxito de la vitrificación de ovocitos requiere un pre-tratamiento con agentes CPAs penetrantes a una concentración relativamente baja antes del tratamiento final con una solución de vitrificación que contiene altas concentraciones de CPAs permeables y no permeables.

2.4.3. Crioprotectores utilizados en la vitrificación de ovocitos y embriones caprinos y sus efectos sobre la viabilidad.

Los CPA's son sustancias empleadas para la protección contra el daño celular que se produce durante los procesos de congelación, vitrificación y desvitrificación debidos principalmente a la formación de cristales de hielo y a una deshidratación inadecuada. Los CPA's alteran las propiedades físico-químicas de las soluciones.

Son moléculas hidrosolubles y de baja toxicidad, que actúan disminuyendo la máxima temperatura a la que puede producirse la mayor cristalización del solvente y del soluto.

Además, disminuyen la temperatura a la que se produce la transición del agua de un estado líquido a sólido, interactuando con las moléculas de agua reduciendo su capacidad de formar enlaces entre ellas. También actúan estableciendo puentes de hidrógeno con otras moléculas biológicas evitando que pierdan su estructura original y por lo tanto, la viabilidad celular (Bajo, 2009).

Los CPA's se clasifican en función de la permeabilidad que poseen para atravesar la membrana celular en dos grupos: CPA'S permeables (intracelulares) y no permeables (extracelulares).

Los CPA's intracelulares son de bajo peso molecular lo cual les permite una alta capacidad de difusión. Los comúnmente empleados en la criopreservación de gametos son el dimetilsulfóxido (DMSO), los glicoles como el etilenglicol (EG) y alcoholes como el propanodiol (PROH) y el glicerol (Palasz y Mapletoft, 1996). Estos actúan principalmente por los siguientes mecanismos: disminuyen el punto de congelación e interactúan con la membrana manteniendo su estructura y previenen el incremento de altas concentraciones de electrolitos, ya que son capaces de unirse a éstos (Arav, 2014). También permiten el flujo osmótico del agua intracelular a la porción extracelular, generando su deshidratación. Los CPA's se distribuyen en la zona citoplasmática celular en el espacio que era ocupado por las moléculas del agua. El uso de altas concentraciones de CPA's a un bajo volumen y el establecimiento de combinaciones entre éstos es indispensable para la optimización de los procesos de criopreservación, especialmente en la vitrificación.

Los CPA's extracelulares son compuestos de alto peso molecular que normalmente se utilizan asociados a los CPA's intracelulares. Ejercen su efecto promoviendo una rápida deshidratación celular aumentando el gradiente osmótico y ayudando a la incorporación, por parte de las células, del CPA permeable durante el proceso de vitrificación (Arav, 2014). Los más utilizados son azúcares como la sucrosa y trehalosa, aunque también se han empleado otras macromoléculas como la polivinilpirrolidona (PVP) (Palasz y

Mapletoft, 1996), el ficol y otras proteínas de alto peso molecular (Bajo, 2009). Aunque estos CPA's son empleados durante la primera etapa de la vitrificación, su principal efecto ocurre durante el proceso de desvitrificación, también llamado calentamiento. Actúan ejerciendo una elevada presión osmótica que genera la salida de los CPA's intracelulares y la reincorporación del agua para regresar a la célula a su estado original.

Las soluciones crioprotectoras se diluyen usualmente en un medio amortiguador, con un pH estable entre 7.2 y 7.4, los más usados son PBS de Dulbecco o algún medio de cultivo como TCM199 o incluso con SSF (Palasz y Mapletoft, 1996).

Los CPA's se han usado en diferentes concentraciones, solos o en combinación, estos requieren estar en altas concentraciones para lograr un alto porcentaje de enfriamiento, por lo que pueden ser tóxicos y el efecto osmótico causado por los movimientos de agua y CPA's al cruzar la membrana pueden inducir alteraciones en su estructura (Leoni *et al.*, 2008).

En los últimos 15 años, por lo menos 20 combinaciones diferentes han sido publicadas para la vitrificación de ovocitos y embriones. El número de variaciones con respecto a las concentraciones, tiempos de incubación y otras condiciones es casi infinito (Vajta, 2000).

La presencia de CPA's de bajo peso molecular o permeables son indispensables, sustituyen el agua intracelular antes del enfriamiento, reducen el cambio en el tamaño de la célula y minimiza la formación de cristales. El glicerol regula la rehidratación y protege la estructura de las proteínas intramembranales, mientras que, los disacáridos como la trehalosa estabilizan la membrana, pero también se ha demostrado que induce la fusión de las membranas a altas concentraciones y temperaturas, lo cual se puede compensar cuando se remueve rápidamente después del calentamiento (Palasz y Mapletoft, 1996).

El Etilén Glicol (EG) es considerado el crioprotector más adecuado para la vitrificación (Fieni *et al.*, 1995, Le Gal *et al.*, 1993), aunque se reportan excelentes resultados cuando se utiliza glicerol (Nowshari y Holtz, 1995) o DMSO (Li *et al.*, 1990) en la criopreservación de embriones producidos *in vivo*. En caprinos se han utilizado diferentes técnicas para

vitrificar embriones producidos *in vivo*, pero hace falta realizar estudios con técnicas eficientes para ovocitos y embriones producidos *in vitro*.

2.4.4. Efecto de la vitrificación y el uso de crioprotectores sobre la ultraestructura de ovocitos.

Una gran cantidad de ovocitos y embriones sufren un daño morfológico y funcional considerable durante la crioconservación. La extensión de la lesión depende de numerosos factores que incluyen el tamaño y la forma de las células, la permeabilidad de las membranas (Palasz y Mapletoft, 1996), el dispositivo de vitrificación (Rao *et al.*, 2012), así como el tipo, la concentración y el tiempo de exposición a los crioprotectores utilizados (Pedro *et al.*, 1996, Arav 1997).

También se ha descrito que las etapas de la maduración meiótica de los ovocitos influyen en la capacidad de los mismos para sobrevivir a la criopreservación (Rojas *et al.*, 2004). El proceso de criopreservación en ovocitos maduros induce la desorganización del huso meiótico, con la consiguiente alteración de los cromosomas (Aman y Parks, 1994, Saunders y Parks, 1999, Morató *et al.*, 2008), microfilamentos de actina y tubulina (Rojas *et al.*, 2004) así como alteraciones en la distribución de gránulos corticales (Fuku *et al.*, 1995, Hyttel *et al.*, 2000, Palmerini *et al.*, 2014), sin dejar de considerar su gran tamaño y su gran contenido de agua (Palmerini *et al.*, 2014). Los ovocitos inmaduros no presentan como tal un huso meiótico organizado, y su criopreservación en este estado puede ser una alternativa recomendable (Rojas *et al.*, 2004). Incluso se han reportado nacimiento de crías vivas a partir de la vitrificación de ovocitos inmaduros bovinos (Vieira, 2002) y Humanos (Chian *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha descrito que durante el estado de VG es más sensible que otros estados nucleares por razones aun no conocidas. Algunas causas posibles pueden incluir el irreversible daño estructural a la membrana del ovocito y la comunicación intercelular dañada entre el ovocito y las células del cúmulo de los ovocitos en VG (Rojas *et al.*, 2004) que indudablemente son indispensables para el proceso de maduración ovocitaria.

Cualquier alteración de estas células, ya sea en estados inmaduros o maduros, tendrá repercusiones en la fertilización normal, excitosis prematura de gránulos corticales,

aumento de la activación partenogénica y daño a los elementos citoesqueléticos del ovocito, particularmente la alteración del huso meiótico (Rojas *et al.*, 2004).

2.5. Producción *in vitro* de embriones caprinos.

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) incluye: 1) colección de ovocitos; 2) la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV); 3) fertilización *in vitro* (FIV) en donde se incluye la capacitación espermática; y 4) el desarrollo de embriones *in vitro* (DIV) hasta llegar al estadio de blastocisto y ser transferido a hembras receptoras o bien ser criopreservados para su posterior transferencia.

Los ovarios de rastro son una fuente abundante de ovocitos para investigación con buena calidad de células del cúmulo (Cognié, 1999). Los ovocitos son colectados por aspiración de folículos o bien por un corte en la corteza ovárica si se trata de ovarios de animales prepúberes.

La selección de ovocitos competentes para la maduración *in vitro*, fecundación y su posterior desarrollo es primordial, siendo un indicador el tamaño folicular; los ovocitos obtenidos de folículos pequeños presentan una calidad morfológica baja y un pobre desarrollo después de la FIV dando una menor proporción de blastocistos que de los aspirados de folículos grandes (>3mm) ya que la adquisición de la competencia meiótica y la competencia de desarrollo posterior del ovocito se produce progresivamente durante el crecimiento folicular (Mermillod *et al.*, 1999, Crozet *et al.*, 1995), debido a que el fluido folicular contiene diversos promotores como péptidos, esteroides y factores de crecimiento que inducen esta maduración, componentes que han sido estudiados e incluidos en medios de MIV.

El proceso de maduración de ovocitos es muy importante ya que de él dependerá el posterior desarrollo de los embriones, en esta etapa los ovocitos son sometidos a un proceso de maduración nuclear y citoplasmática sincronizada concluyendo con la expulsión del primer cuerpo polar, por lo cual se debe proporcionar el medio adecuado con los factores y condiciones que inducen tal suceso.

El medio de maduración comúnmente utilizado es el TCM 199 suplementado con hormonas FSH, hormona Luteinizante (LH) y 17β Estradiol así como el uso de componentes Thiol debido a que estos incrementan la concentración intracelular de glutatión, protegiendo a la célula del estrés oxidativo (Cognié *et al.*, 2004, Rodríguez-González *et al.*, 2003); también se ha utilizado de manera rutinaria la adición de suplementos tales como, Suero de Cabra en Estro (EGS), Fluido Folicular (FF) y EGF con la adición de EGS.

Rodríguez-González *et al.*, (2003) reporta una producción de blastocistos del 33.8%; con medio de maduración enriquecido con 10% de FF, Cognié *et al.*, (2003) obtuvieron una producción de blastocistos de 43%, y con respecto a la adición de EGF se reporta el 35% de producción de blastocistos (Cognié *et al.*, 2004). Aunque se reportan resultados favorables con el uso de FF y EGS para suplementar medios de maduración se requieren mayores evaluaciones por las diversas variaciones químicas de estos componentes (Paramio, 2010).

En la FIV se puede utilizar tanto semen fresco como semen congelado, así como semen convencional o sexado, algunos medios que se han utilizado para la capacitación espermática de semen congelado son, medio Sintético de Oviducto (SOF) con 10% de EGS Cognié *et al.*, (2003) y medio Tyrode, Albumina, Lactato y Piruvao (TALP) (Katska *et al.*, 2004); para la capacitación de semen fresco los medios utilizados son medio de TALP (Palomo *et al.* 1999, Katska *et al.*, 2004, Pradeep *et al.*, 2011), y mDM (medio definido modificado) (Balsadarre *et al.*, 2003, Izquierdo *et al.*, 2002, Koeman *et al.*, 2003).

En la fertilización de ovocitos caprinos los medios más utilizados son medio TALP descrito por Parrish *et al.*, (1986) suplementado con Hipotaurina y Glutatión teniendo un porcentaje de división del 60.27 % y de eclosión del 72.92 %, (Romaguera *et al.*, 2010a 2010b); medio de TALP con EGS y ácido pirúvico se han reportado un porcentaje de división del 50.7 % (Koeman *et al.*, 2003), con el medio TALP adicionado con Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina (TALP-Fert) se ha obtenido una división del 52.8% (Pradeep *et al.*, 2011) y por otro lado un 66% de ovocitos fertilizados (Wang *et al.*, 2002).

Cognié *et al.*, (2003) con medio SOF suplementado con 10% de EGS reporta un 84% de división y 48% de eclosión.

Se tienen reportes que los embriones caprinos cultivados *in vitro* no se desarrollan más allá de las etapas de 8 a 16 células en medios de cultivo tradicionales, ya que ocurre un bloqueo en el tiempo que se activa el genoma embrionario (Paramio, 2010), se han utilizado diferentes tipos celulares de co-cultivo para evitar este bloqueo. Con el uso de células epiteliales de oviducto caprino (GOEC) y en condiciones ambientales de 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂, se ha visto un incremento en el porcentaje de mórulas y blastocistos (21.3% vs 3.7% medio TCM199 con y sin co-cultivo de GOEC respectivamente) (Izquierdo *et al.*, 1999). Comparando desarrollo embrionario en medio SOF suplementado con Albúmina Sérica Bovina (BSA) con y sin co-cultivo en monocapas de GOEC se reporta una tasa de producción de blastocistos de 20% y 28% respectivamente, sin embargo después de vitrificados los embriones, los cultivados con GOEC demostraron mejores tasas de gestación (56% vs 14%) y supervivencia embrionaria (33% y 9%, para GOEC y SOF respectivamente) (Rodríguez-Dorta *et al.*, 2007). Pradeep *et al.*, (2011) utilizó en medios de desarrollo de embriones la adición de una glicoproteína específica del oviducto (Oviductina), teniendo una producción de blastocistos del 16% y 25% con y sin la adición de Oviductina, respectivamente.

2.5.1. Evaluación de desarrollo embrionario.

Uno de los factores más importantes para determinar el éxito y la aplicación de estas tecnologías, antes de la transferencia, es sin duda la evaluación de los embriones obtenidos.

Con el progreso de las biotecnologías como la PIVE, la transferencia nuclear y la transgénesis, cobra trascendencia la aplicación de técnicas invasivas de evaluación embrionaria para eliminar las dificultades tecnológicas inherentes a las diferentes formas *in vitro* de producción de embriones (Maddox-Hyttel, 2003). Esas técnicas incluyen métodos ópticos de estudio de imágenes como la microscopía electrónica y el microscopio confocal, que permite la observación en diferentes cortes del embrión. Las tecnologías ópticas, combinadas con los estudios moleculares permiten también estudios

de la calidad del embrión, actualmente conocidos como bioimágen (bioimaging). Algunas de las técnicas moleculares son también el resultado natural de las propias observaciones estructurales, como es el caso de los embriones con fragmentación celular o pérdida de blastómeros (Van Soom *et al.*, 2003; Stone *et al.*, 2005), la cual es considerada como indicadora de apoptosis o muerte celular programada. En consecuencia, la observación de embriones con blastómeros desprendidos podría constituir un marcador no invasivo de apoptosis en el embrión.

La evaluación de la calidad de los embriones fue establecida originalmente en forma morfológica para los programas comerciales de transferencia de los embriones obtenidos, por medio de tratamientos superovulatorios en las especies domésticas y humana (Palma, 2015).

La evaluación óptica del desarrollo embrionario evalúa características como forma, tamaño, apariencia, simetría e intensidad de color de las células embrionarias, permite asignarle un valor predictivo al éxito de las biotecnologías reproductivas. Debido a las características de la evaluación, el valor estimado de ésta dependerá de la habilidad y experiencia del evaluador, estimando que el grado de coincidencia entre evaluadores es de entre un 80 – 90% para el grado y 70% para la de calidad (Palma, 2015).

El mejor predictor de la viabilidad de un embrión es su etapa de desarrollo en relación con lo que debería ser en un día determinado después de la FIV. Un embrión ideal es compacto y esférico. Los blastómeros deben ser de tamaño similar con color y textura uniformes. El citoplasma no debe ser granular ni vesiculado. El espacio perivitelino debe ser claro y no contener residuos celulares. La zona pelúcida debe ser uniforme; no agrietada ni colapsada y no contiene residuos en su superficie (Bo y Mapetloft, 2013).

Los sistemas de codificación estandarizados para su uso, en los que se refieren la etapa de desarrollo y la calidad del embrión se describen en el Capítulo 9 y se ilustran en el Apéndice D del Manual de IETS (International Embryo Transfer Society). El código para la etapa de desarrollo es numérico, desde "1", un ovocito no fertilizado o un embrión de 1 célula hasta "9", blastocisto expandido o eclosionado.

El grado de calidad es una estimación de la predicción de sobrevivencia embrionaria. Uno de los sistemas de clasificación consiste en cuatro categorías (grados 1, 2, 3 y degenerados). Grado 1: Indica que el embrión es casi perfecto con más de 98% de la masa celular activa y saludable. Grado 2: Indica que el 70 a 98% de la masa celular es activa y saludable; pueden presentarse algunas blastómeras extruidas. Grado 3: Indica que los embriones son de baja calidad, presentan menos del 70% de la masa celular activa y saludable; varias blastómeras se presentan extruidas. Los embriones degenerados no presentan signos de masa celular activa y la mayoría de las membranas presentan ruptura (Gibbons y Cueto, 2103).

En algunos embriones se puede observar desprendimiento parcial de células en el espacio perivitelino. Esta característica es tolerable si el resto conforma una masa celular uniforme y sin opacidad. Cuando los embriones son dudosos, se recomienda realizar una segunda observación a las dos horas. Este tipo de examen morfológico no constituye un test absoluto de la viabilidad embrionaria. Sin embargo se presentan diferencias significativas en la sobrevivencia embrionaria cuando se transfieren embriones de calidad regular respecto a la calidad buena o excelente (Gibbons y Cueto, 2103).

3. Objetivos.

3.1. *Objetivo general.*

Producción de embriones *in vitro* a partir de ovocitos caprinos madurados *in vitro* y vitrificados en Cryotop.

3.2. *Objetivos particulares.*

- Evaluación de la maduración de ovocitos *in vitro* de ovocitos caprinos.
- Obtención de embriones caprinos a partir de ovocitos madurados *in vitro*.
- Obtención de embriones caprinos a partir de ovocitos madurados *in vitro* y expuestos a una solución crioprotectora al 15% de EG, 15% DMSO, 0.4 M de Sucrosa en TCM199 con 20% de SFB.
- Obtención de embriones caprinos a partir de ovocitos madurados *in vitro*, expuestos a crioprotectores y vitrificados en cryotop.
- Evaluación del daño a la ultraestructura de tubulina, así como del estado de maduración y estructura y distribución de cromosomas en ovocitos madurados *in vitro* y vitrificados en cryotop, mediante la técnica de Inmunohistoquímica.
- Evaluación de la calidad y desarrollo embrionario *in vitro*, sobre el porcentaje de embriones divididos, embriones de más de 6 células, obtención de mórulas y blastocistos al día 5, 6 y 7.

4. Hipótesis.

Si la producción de embriones caprinos a partir de ovocitos madurados *in vitro* y vitrificados en Cryotop es similar a la de ovocitos frescos, entonces se podrán obtener embriones de calidad transferible para posteriormente conseguir porcentajes de gestación y nacimiento de crías vivas con éxito por medio de la técnica de vitrificación de ovocitos.

5. Metodología

5.1. Etapa 1. Maduración *in vitro* de ovocitos caprinos

5.1.1. Colecta de ovarios.

Se colectaron ovarios de un rastro particular en la comunidad de Capulhuac de Mirafuentes, Edo. de México, México. Las hembras que llegan a este rastro son provenientes de varias partes de la República, como: Aguascalientes, Hidalgo, San Luis Potosí, Guanajuato, Guadalajara, Puebla y Zacatecas. Las hembras variaban en características como tipo racial, edad y estado reproductivo. Los ovarios colectados fueron transportados al Laboratorio de Fertilización *In Vitro*, ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, en un tiempo aproximado de 2 hrs y media.

El material biológico se transportó en un recipiente de almacenamiento aislante, con SSF adicionando Penicilina Estreptomicina 50 UI/ml a una temperatura de 37°C. Llegando al laboratorio se lavaron dos veces con SSF atemperada en vasos de precipitado, y se pasaron a un baño maría para mantener la temperatura constante.

5.1.2. Aspiración del líquido folicular.

La aspiración folicular se llevó a cabo en una charola de plástico, sobre una mesa. El ovario se secó perfectamente con toallas de papel. Para la obtención de ovocitos, la aspiración se realizó por el método de punción folicular con aguja hipodérmica calibre 18G x 1½" y jeringa de plástico sin goma de silicón en el émbolo. La aspiración se realizó puncionando con la aguja superficialmente el parénquima ovárico y todos los folículos con un diámetro entre 2 y 5 mm que se encontraban cerca del sitio de punción fueron aspirados, manteniendo la aguja dentro del tejido ovárico para ejercer una presión negativa, tratando de evitar que la muestra se contaminara con sangre y otros tejidos.

5.1.3. Selección de ovocitos.

El líquido folicular obtenido se pasó a cajas de Petri grandes y se lavaron 2 veces con TL – HEPES. Por último, se realizó la selección de los ovocitos en un microscopio

estereoscópico bajo una campana de flujo laminar. Dicha selección se realizó mediante la evaluación morfológica según su apariencia citoplasmática y el número de capas que lo rodean o COC's, clasificándolos en 4 categorías o grados de calidad (adaptado de: De Loos *et al.*, 1989; Baldasarre *et al.*, 1994; Wani *et al.*, 1999, 2000, Kane., 2003):

1. Excelente. Ovocitos esféricos y simétricos; de tamaño, color y textura uniforme; citoplasma homogéneo, rodeados de tres a cinco capas completas de células del cúmulo que son compactas, COCs completo y de color claro.
2. Buena. Ovocitos esféricos y simétricos; tamaño, color y textura uniforme, pero con pérdida parcial de las capas del cúmulo (COCs incompleto). Con cubierta celular múltiple y compacta, citoplasma homogéneo, con una zona más oscura en la periferia del ovocito y COCs oscuro o menos claro que los de la categoría 1.
3. Regular. Ovocitos esféricos y simétricos; de tamaño, color y textura uniforme, pero sólo con el recubrimiento de la corona radiada.
4. Mala. Complejo cúmulo-ovocito totalmente degenerado u ovocitos totalmente desnudos.

Para éste trabajo se utilizaron solo los ovocitos de las categorías 1 y 2, eliminándose los de las categorías 3 y 4 porque se ha demostrado que tienen menos potencial para madurar *in vitro*, y gran parte de los ovocitos de la categoría 4 degeneran bajo condiciones *in vitro* (De Loos *et al.*, 1989).

5.1.4 Maduración de ovocitos.

Para la maduración de ovocitos *in vitro*, se utilizó un Medio de Maduración (MM) el cual consistía en Medio TCM 199 (Tissue Culture Medium, In vitro S.A., México, ME-046) adicionado con 0.3 mg/mL de BSA, 5 µl/mL de FSH (Sigma, F2293), 5 µl/ml de LH (LH; Sigma, L5269), 0.32mM de ácido pirúvico (Sigma, P5280) y 10 µl/ml de penicilina-estreptomina (P/E; Sigma, P4333) (Izquierdo *et al.*, 2002). Los ovocitos se colocaron en gotas de 100 µL de MM cubiertas con aceite mineral, en cajas de Petri de 35 mm, cada gota contenía hasta 50 ovocitos, se mantuvieron en la incubadora durante 27 h con una

atmósfera de 5% de CO₂ con humedad a saturación y una temperatura de 38.5 °C (Izquierdo *et al.*, 2002).

5.2. Etapa 2. Vitrificación de ovocitos.

5.2.1 Vitrificación de ovocitos.

Transcurridas 24 h del inicio de la maduración los ovocitos se dividieron en 3 grupos. Grupo 1 o control (ovocitos que se mantuvieron madurando en la incubadora, sin ningún cambio durante las 27 h requeridas), Grupo 2 o CPA's exp (ovocitos que fueron expuestos a las soluciones crioprotectoras sin vitrificarse en nitrógeno líquido (LN₂)), Grupo 3 o Vitrificado, ovocitos vitrificados en cryotop.

Para el proceso de vitrificación los ovocitos seleccionados fueron puestos en una solución de Medio Base (MB) que contenía TCM 199H adicionado con 20% de SFB (Purohit *et al.*, 2011, Morató *et al.*, 2008), posteriormente fueron suspendidos en Solución de Equilibrio (SE) MB con 7.5 % de EG y 7.5% de DMSO a 34°C durante 9 min; luego los ovocitos se pasaron por tres gotas de medio de vitrificación (MV) (15% de EG, 15% DMSO, 0.4 M de Sucrosa en MB), se colocaron alrededor de 3-4 ovocitos por cryotop (Kitazato Ltd., Japón), se eliminó el exceso de solución dejando solo una capa que cubriera el ovocito e inmediatamente se sumergió en un contenedor de unicel con NL₂, e instantáneamente fueron vitrificados; dicho proceso debe hacerse en un tiempo estimado de 30 a 45 segundos aproximadamente (Begin *et al.*, 2003).

5.2.2. Calentamiento de los ovocitos.

Para el calentamiento de los ovocitos, el dispositivo de vitrificación fué colocado en una solución de MB y 0.3 M de Sucrosa durante 1 min a 39 °C, con el fin de que los ovocitos se desprendieran del cryotop. Posteriormente los COC's se lavaron en cajas de 4 pozos que contenían concentraciones decrecientes de Sucrosa 0.25 M y 0.125 M, sucesivamente, durante 3 min cada uno. Por último, se procederá a lavar los ovocitos con el medio MB sin Sucrosa y se regresan a la incubadora para su recuperación, por un tiempo aproximado de 2 h.

Finalmente, un porcentaje de cada uno de los 3 grupos fué desnudado completamente y puesto en una solución de paraformaldehído al 2% para su posterior evaluación

mediante la técnica de Inmunohistoquímica, el resto continuará con el proceso para la producción de embriones *in vitro*.

5.2.3. Evaluación de la ultraestructura del ovocito. Técnica de inmunohistoquímica para ovocitos.

La evaluación de la ultraestructura de microtúbulos, así como la evaluación del huso meiótico y la organización de cromosomas fueron realizadas mediante las técnicas descritas por Rojas *et al.* (2004), Velilla *et al.* (2005) y Morató *et al.* (2008).

Después de 27 h de maduración, los ovocitos fueron desnudados completamente mediante pipeteo y fijados en una solución de paraformaldehído al 2% hasta el momento de realizar la prueba de inmunohistoquímica. Al momento de realizar la técnica, los ovocitos fueron lavados 3 veces con PBS durante 5 min cada uno con el objetivo de eliminar el paraformaldehído, posteriormente los ovocitos son permeabilizados utilizando Triton X-100 al 2% (v/v) en PBS durante 15 min a 37°C. Transcurrido ese tiempo se colocaron en una solución de PBS-BSA al 1% (p/v), seguido de la colocación de los anticuerpos. Entre cada uno de los tratamientos los ovocitos se lavan 3 veces con PBS.

Para la Inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- α -tubulina (1:250) y antimouse IgG Alexa-Fluor 488 (1:500), los cuales fueron incubados durante toda la noche, a una temperatura de 4°C, transcurrido ese tiempo los ovocitos fueron lavados 3 veces con PBS y posteriormente grupos de 5 ovocitos fueron montados en un portaobjetos y teñidos con 4,6-clorhidrato de diamidino-2-fenilindol o DAPI, por último se colocó el cubreobjetos sellándolo con esmalte de uñas. A partir de ahí se mantuvieron cubiertos de la luz y a una temperatura de 4°C hasta el momento de la evaluación, para lo cual no debe pasar de 48 h.

Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio confocal (Leica SP8, Wetzlar, Alemania) con un aumento de 63x. Los criterios de evaluación de cromosomas y microtúbulos se basaron en el estudio de Albarracín *et al.* (2005).

5.3. Etapa 3: Producción de embriones *in vitro* a partir de ovocitos calentados.

Una vez calentados los ovocitos como se indica en la parte 2 del experimento, los ovocitos continuarán con la fertilización y el desarrollo embrionario, para lo cual se realizaron los siguientes pasos.

5.3.1. Capacitación espermática.

Una hora antes de la FIV se capacitó el semen, para lo cual se utilizó semen caprino congelado en pajillas de 0.25cc y se seleccionó por diferencias de gradientes de Percoll (Sigma, P4937) los espermatozoides viables. Para esto se utilizó la técnica de minipercoll en un tubo eppendorf de 1000 ul se colocaron 200ul de percoll al 90% y por encima de éste percoll al 45% con sumo cuidado evitando que las columnas se mezclaran, por último, se colocaron 200 ul de semen descongelado en la parte superior y se centrifugo a 360 gradientes durante 20 min. Los espermatozoides móviles se encuentran principalmente en el sedimento del esperma en la parte inferior del gradiente. El botón espermático obtenido en el fondo del tubo se recuperó y se lavó con 1ml de PBS centrifugándolo de nuevo a 260 gradientes durante 5 min. El paquete celular se re-suspendió en MF con 50 µg/ml de Heparina, a fin de obtener una concentración de 1×10^6 espermatozoides por ml y posteriormente serán incubados durante 30 minutos en medio de capacitación, a una atmósfera de 5% de CO₂ en aire con máxima humedad y una temperatura de 38.5 °C.

5.3.2. Fertilización *In Vitro*.

Se procedió a una selección de ovocitos, desechando aquellos que estuvieron desprovistos de células del Cúmulo y de la Corona (desnudos), así como todos aquellos que mostraron daño en la ZP, cambios en su coloración, presencia de vacuolas, o cualquier otro tipo de anomalías. Para la FIV de los ovocitos previamente seleccionados, grupos de 20 a 25 ovocitos fueron transferidos a microgotas de 100 µl de MF bajo aceite mineral y fueron co-cultivados con 5 µl de espermatozoides capacitados durante 18 h a 38 °C, con una atmósfera de 5% de CO₂ en aire con máxima humedad y una temperatura de 38.5 °C.

5.3.3. Desarrollo Embrionario.

Concluido el tiempo de incubación para la FIV, los presuntos cigotos se lavaron con medio SOF y se desnudaron mediante pipeteo para separar el remanente de las células del cúmulo y espermatozoides. Posteriormente, grupos de 5 a 10 embriones se colocaron en 10 µl de Medio de Cultivo Embrionario (MCE) bajo aceite mineral y se cultivaron durante 7 días en una atmósfera de 6% de CO₂ en aire con máxima humedad y una temperatura de 38.5 °C. Se evaluaron los porcentajes de división a las 72 h post inseminación (hpi) por medio de la observación visual de blastómeros, así como de mórulas, blastocistos y eclosión 5, 6 y 7 días post inseminación (dpi) respectivamente.

5.3.4. Evaluación de la calidad Embrionaria.

La calidad embrionaria se evaluó según lo descrito por Bo y Mapletoft (2013), en base a sus aspectos morfológicos, con ayuda de un microscopio invertido a un aumento de 100X. Se utilizó una micropipeta o pipeta de vidrio fina que permitió mover los embriones, para poder observarlos desde varios ángulos. Se determinó tanto el grado como la calidad de los embriones producidos por cada tratamiento para determinar la efectividad de los crioprotectores y de la vitrificación.

5.4. Análisis Estadístico

Dado que todas las variables que se estudiaron fueron expresadas en porcentajes, éstas previamente se transformaron a valores arcoseno (Steel y Torrie, 1985), para su análisis estadístico. Posteriormente se utilizó un modelo de Análisis de Varianza (ANOVA) con arreglo totalmente aleatorizado. Se realizó una prueba de Tukey para comparar la diferencia entre medias. Lo anterior utilizando el programa SAS (Versión 8).

6. Resultados

6.1. *Maduración In Vitro de ovocitos caprinos*

En la figura 4a y 4b se muestra la evaluación de los ovocitos mediante microscopía confocal evaluada mediante inmunotinción de alfa-tubulina y DAPI para los microtubulos y cromosomas respectivamente.

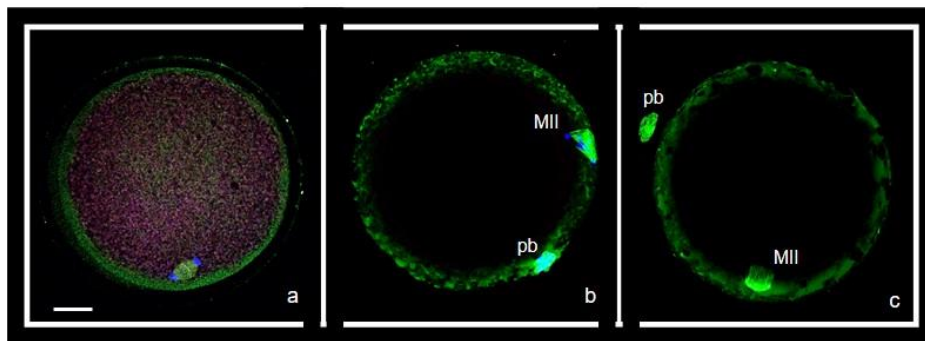


Fig 4a. a) Ovocitos en Metafase I, b) y c) Ovocito en Metafase II (MII, Cuerpo polar (pb))
Nota: Fotografía tomada en la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. Delgado y González, 2019.

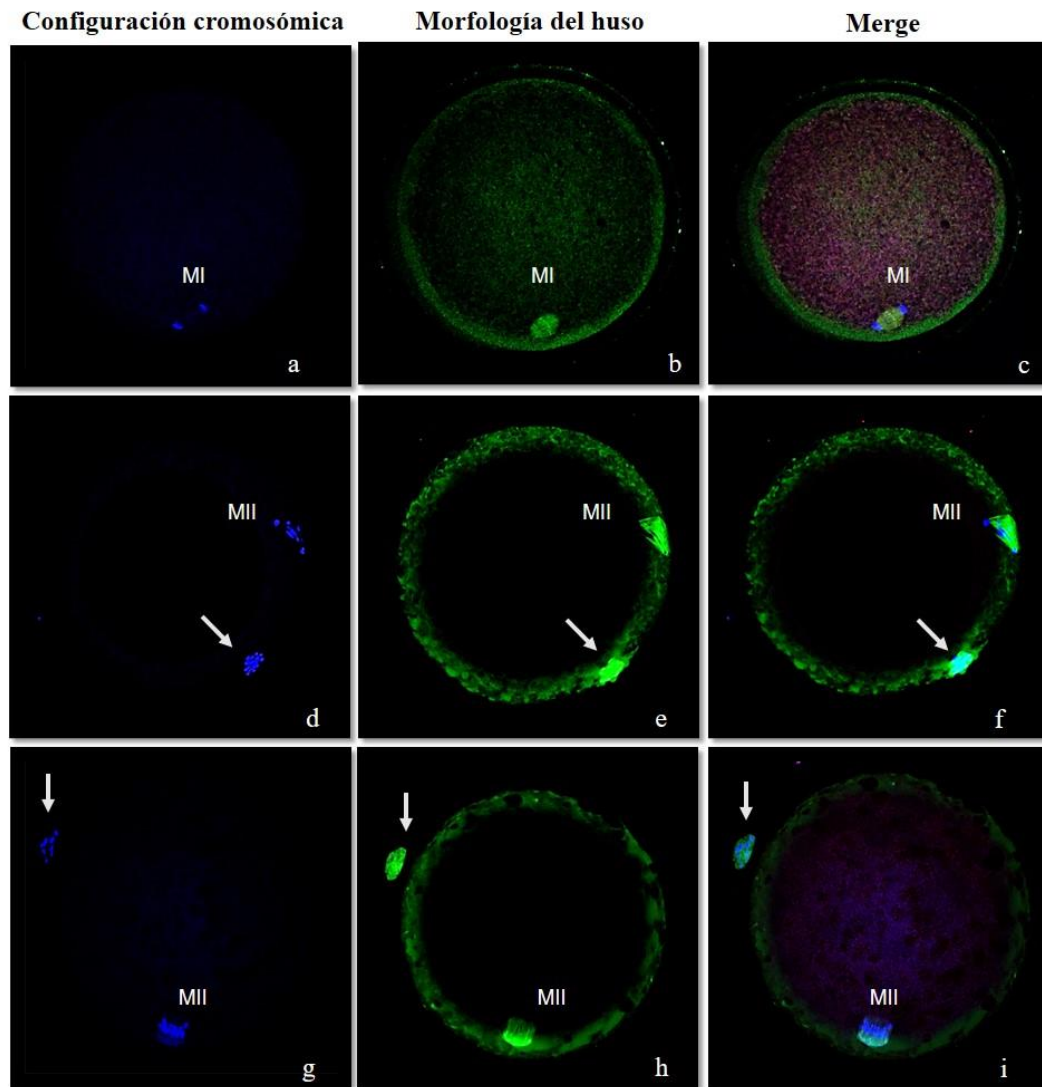


Fig. 4b Diferentes estadios de la meiosis, visualización de cromosomas y morfología del huso cromosómico en ovocitos caprinos madurados *in vitro*. a, b y c) anafase en meiosis I. d, e, f, g, h e i) Ovocitos en metafase II. Las flechas indican el primer cuerpo polar.

Nota: Fotografía tomada en la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. Delgado y González, 2019.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de ovocitos caprinos, madurados *in vitro*, expuestos a crioprotectores y vitrificados en cryotop. No se encontró una diferencia estadística significativa en alguno de los grupos, con esto aseguramos que los 3 grupos tuvieran similares porcentajes de ovocitos en el mismo estadio de maduración (MII, Metafase II) tanto al momento de hacer la inmunohistoquímica como para la FIV.

Tabla 1. Evaluación de la maduración de ovocitos caprinos, madurados *in vitro* y expuestos a crioprotectores y vitrificados en cryotop.

Grupo	Maduración			
	n	VG (%)	MI (%)	MII (%)
Control	140	21 (15) ^a	26 (18.57) ^a	93 (66.4) ^a
CPA's exp	94	16 (17) ^a	19 (20.21) ^a	59 (62.8) ^a
Vitrificado	70	10 (14.3) ^a	14 (20) ^a	46 (65.7) ^a

^aNo se encontró diferencia estadística significativa en ninguna columna ($p > 0.05$).

6.2. Evaluación de la ultraestructura del ovocito. Técnica de inmunohistoquímica para ovocitos.

De la evaluación inmunohistoquímica de los ovocitos en la tabla 2 se muestra el análisis de la estructura de microtúbulos y cromosomas, en donde se puede observar que la distribución de cromosomas en el grupo control y el expuesto a CPA's no tuvieron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$), sin embargo, para el grupo de ovocitos vitrificados hubo una diferencia entre los dos grupos anteriores. De la evaluación de la estructura de microtúbulos se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el grupo control, con respecto a los grupos expuestos a CPA's y vitrificados ($p < 0.005$). La Fig. 5 muestra las imágenes más representativas de la distribución de cromosomas y estructura de los microtúbulos.

Tabla 2. Análisis de la distribución de cromosomas y la estructura y configuración de microtúbulos de ovocitos caprinos, madurados *in vitro* y expuestos a crioprotectores y vitrificados en cryotop.

Grupo	Cromosomas				Microtúbulos		
	n	Normal (%)	Dispersos (%)	Descondensados (%)	Normal	Anormal	Ausente
Control	140	69 (49.29) ^a	45 (32.14) ^a	26 (18.57) ^b	62 (44.3) ^a	49 (35) ^a	29 (20.71) ^b
CPA's exp	94	44 (46.81) ^{ab}	29 (30.85) ^a	21 (22.34) ^b	29 (30.9) ^b	31 (33) ^a	34 (36.17) ^a
Vit	70	26 (37.14) ^b	17 (24.29) ^a	27 (38.57) ^a	17 (24.3) ^b	21 (30) ^a	32 (45.71) ^a

^{a,b,c}. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

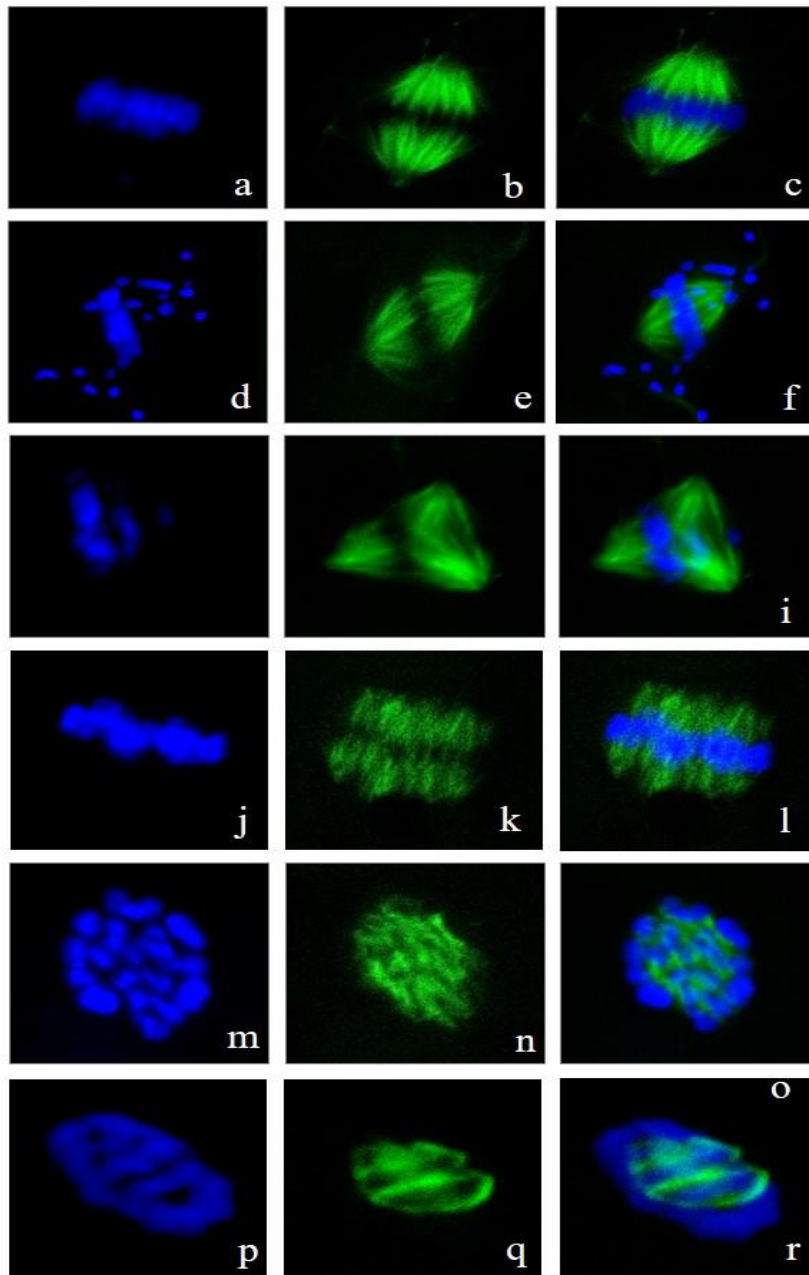


Fig. 5 Distribución de cromosomas y conformación de microtúbulos. (a, b y c) se observan cromosomas normales, compactos, huso acromático normal, simétrico, con microtúbulos unidos en el ecuador de la placa metafásica, (d, e y f) cromosomas dispersos, configuración normal de microtúbulos. (g, h, i) se observan algunos cromosomas dispersos, distribución anormal de microtúbulos, (j, k, l) distribución normal de cromosomas, microtúbulos aplanados en los polos. (m, n, o) cromosomas y microtúbulos desorganizados, (p, q, r) cromosomas descondensados y microtúbulos desorganizados. Nota: Fotografía tomada en la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. Delgado y González, 2019.

6.3. Fertilización y desarrollo embrionario a partir de ovocitos vitrificados.

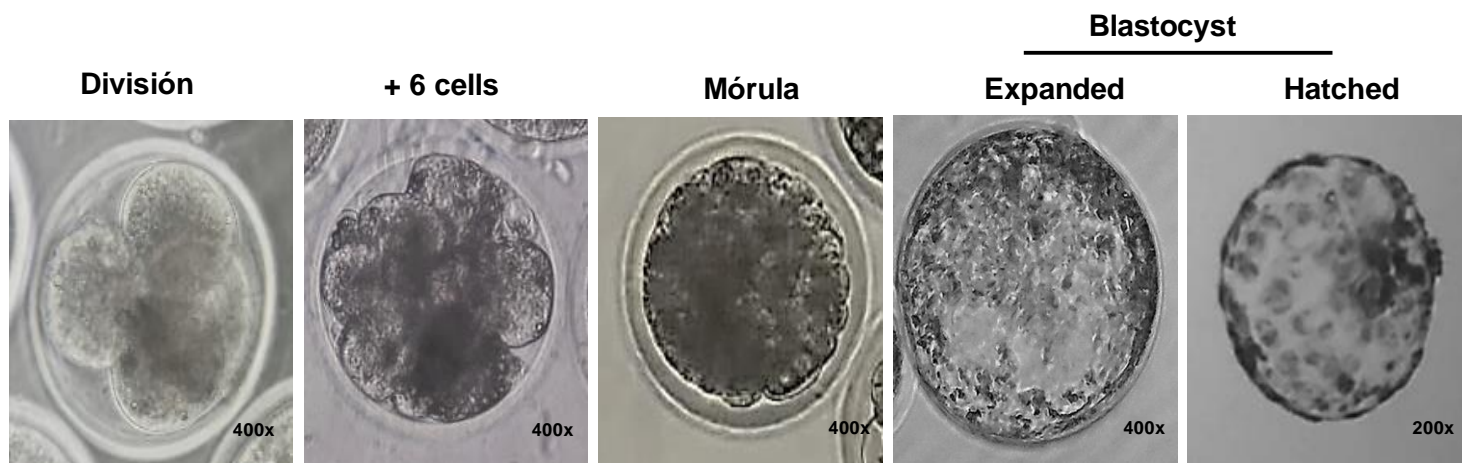
El desarrollo de embriones *in vitro* se evaluó a partir de las 48 hpf (división embrionaria) hasta la obtención de blastocistos los cuales se muestran en la tabla 3. Las tasas de división, desarrollo embrionario, obtención de mórulas y blastocistos, fueron significativamente mas bajas ($p < 0.05$) para ovocitos expuestos al crioprotectos y vitrificados en cryotop que en el grupo control. La Fig. 6 muestra una imagen representativa de los embriones producidos *in vitro* y evaluados mediante microscopia de campo claro en un microscopio invertido, se muestran los diferentes estadios de evaluación embrionaria.

Tabla 3. Efecto de la exposición del crioprotector y de la vitrificación de ovocitos caprinos madurados *in vitro* sobre el desarrollo de embriones.

	n	División (%)	+ de 6 cels (%)	Mórula (%)	Blastocistos (%)
Control	810	442 (54.7) ^a	292 (36.4) ^a	153 (18.8) ^a	51 (6.2)
Exp's	748	272 (36.6) ^b	80 (11.3) ^b	6 (0.8) ^b	-
Vitrificados	762	157 (21.3) ^c	49 (8.3) ^b	1 (0.1) ^b	-

^{a,b,c}. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Fig.6. Evaluación del desarrollo embrionario a partir de ovocitos caprinos. Se muestran los diferentes estadíos de evaluación embrionaria.



Fotos tomadas en el Laboratorio de Producción de Embriones *In Vitro* de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México, México. González-Silvestry, 2019.

7. Discusión

El desarrollo continuo de tecnologías de reproducción asistida para el tratamiento de la infertilidad depende en gran medida de la criopreservación de gametos y embriones. La vitrificación es una técnica utilizada para la criopreservación de ovocitos en diferentes especies, sustancialmente es menos dañina que los métodos tradicionales de conservación de congelación lenta para este tipo de células, cuya sensibilidad al enfriamiento es alta (Morató *et al.*, 2008^b).

En este estudio se analizó la distribución de cromosomas, la estructura y configuración de microtúbulos, así como la capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos caprinos madurados *in vitro* y vitrificados en Cryotop.

A diferencia del grupo control, nuestros resultados no mostraron obtención de blastocistos a partir de ovocitos expuestos al crioprotector y vitrificados; pudiéndose deberse, como ya se ha descrito, a numerosos factores, entre ellos la calidad de los ovocitos, los medios de maduración utilizados, la concentración de crioprotectores, la velocidad de enfriamiento, y los medios de cultivo embrionario adecuados.

La MIV de ovocitos caprinos es una técnica de rutina realizada durante la obtención de embriones para la investigación (Fan *et al.*, 2017). La etapa de la maduración meiótica de los ovocitos influye sobre la capacidad de estos para sobrevivir a la criopreservación, ya que presentan una mayor estabilidad en la membrana durante el enfriamiento por lo que resultan ser más resistentes a la criopreservación (Rojas *et al.*, 2004) y se ha indicado también un mayor desarrollo embrionario a partir de ovocitos maduros vitrificados (Chaves *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha descrito que la vitrificación de ovocitos inmaduros en estado de VG pudieran ser más tolerantes a la exposición a crioprotectores (Kharche *et al.*, 2005).

Durante la MIV los ovocitos reanudan la Meiosis I arrestados en (diploteno) mediante condiciones adecuadas de cultivo (MM, condiciones y tiempo de incubación). Sin embargo, es sabido que la capacidad de los ovocitos madurados *in*

vitro es menor comparado con los ovocitos madurados *in vivo* (Khatun *et al.*, 2011, Fan *et al.*, 2017). Existen diversos factores por los que la MIV puede ser afectada, por ejemplo, la edad de la donadora (Izquierdo *et al.*, 2002), la estación del año (Samaké *et al.*, 2000), el tiempo de transporte de los ovarios al lugar de procesamiento (García *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011), el tamaño folicular (Romaguera *et al.*, 2010). Por ejemplo Yang *et al.* (2016), obtuvo porcentajes de 51.6% de maduración en ovocitos provenientes de folículos mayores a 3mm, resultados similares a los presentados en este trabajo.

A través de los años, los investigadores han desarrollado diferentes medios de maduración para ovocitos caprinos intentando mejorar la eficiencia de la MIV (Martino *et al.*, 1994, Kharche *et al.*, 2005, Mukherjee *et al.*, 2014, Souza-Fabjan *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2015). Fan *et al.*, (2017), comparó la maduración nuclear de ovocitos caprinos con 3 medios de maduración diferentes (medio definido, semi definido y medio no definido) obteniendo porcentajes de maduración nuclear del 43.4%, 52% y 37.7%, respectivamente. El medio utilizado en el presente trabajo fue semidefinido obteniendo porcentajes de maduración nuclear entre 62.8% y 66.4%. Los medios semidefinidos al contener productos de origen animal (BSA, SFB, entre otros) son una fuente de variación en el sistema de cultivo y en los resultados que se obtienen (Gardner, 2008; Santa Cruz *et al.*, 2014).

Sin duda, también la calidad del ovocito es un requisito indispensable para una óptima maduración, fecundación y obtención de embriones *in vitro* (Chaves *et al.*, 2017, Souza-Fabjan *et al.*, 2016). Por lo tanto, cuando se obtienen ovocitos de hembras provenientes de mataderos o rastros, no se conoce la calidad de estos, así como de los folículos que pudieran encontrarse en proceso atresico. Esto podría dar como resultado una tasa relativamente baja de ovocitos que alcanzan la etapa de blastocisto (Souza-Fabjan *et al.*, 2014). A pesar de ello, los ovarios obtenidos de matadero son la mejor forma de obtener una gran cantidad de ovocitos para la investigación de manera económica y mayormente utilizada para la mejora de la producción *in vitro* de embriones (Souza-Fabjan *et al.*, 2014). El alto porcentaje de

ovocitos con maduración anormal podría deberse a los folículos heterogéneos los cuales no se pueden determinar mediante su observación si dichos folículos son sanos o atrésicos y, en consecuencia, podría ser una de las causas del bajo desarrollo embrionario.

En este estudio, una gran cantidad de ovocitos sufrieron un daño morfológico y funcional considerable durante y después de la crioconservación pudiendo deberse al estrés osmótico resultante de la exposición a altas concentraciones de crioprotector que hace que los ovocitos experimenten cambios dramáticos de volumen durante el equilibrio como lo señala Prentice *et al.*, (2012), lo que provoca daños a diferentes organelos y componentes del citoesqueleto, como a los microfilamentos de actina y tubulina (Rojas *et al.*, 2004) así como alteraciones en la distribución de gránulos corticales (Fuku *et al.*, 1995, Hyttel *et al.*, 2000) y a nivel mitocondrial (Cao *et al.*, 2017; Chaves *et al.*, 2017). Por su parte Liu *et al.*, (2020) mostraron que durante la maduración *in vitro* de ovocitos caprinos el 22.93% presentan una dispersión de cromosomas y 25.94% de microtúbulos con alguna anormalidad, atribuido principalmente a la expresión de la enzima LSD1 (lysine-specific histone demethylase 1A), en el presente estudio la dispersión de los cromosomas durante la maduración presentó un porcentaje mayor (32.14%) que lo reportado por Liu *et al.*, (2020), así como la presencia de microtúbulos anormales (35%). A pesar de ello, durante la exposición a crioprotectores la dispersión y descondensación de cromosomas fue constante (30.85% y 22.34%). Sin embargo, posterior a la vitrificación la descondensación de los cromosomas aumentó (38.57%). Por otro lado, durante la exposición a crioprotectores y posterior a la vitrificación los microtúbulos mantuvieron constantes sus porcentajes de anormalidades (33 y 30%), aunque aumentó la ausencia de microtúbulos (25%), tal como lo reporta Albarracín *et al.* (2005), un 20% posterior a la vitrificación en ovocitos bovinos, demostrando que la vitrificación produce severos daños a la morfología, pérdida y desorganización de microtúbulos dando como resultado una dispersión cromosómica (Albarracín *et al.*, 2005, Kharche *et al.*, 2005, Morató *et al.*, 2008, Chaves *et al.*, 2017).

Una correcta configuración de microtúbulos es responsable de la reorganización y migración de los cromosomas y del posicionamiento mitocondrial, además éstos juegan un papel importante durante la maduración y fertilización de los ovocitos (Velilla *et al.*, 2005). Una alteración en cualquiera de estas estructuras puede provocar aneuploidías y tienen una alta relación con la fertilización y el desarrollo embrionario (Wang *et al.*, 2001, Rienzi *et al.*, 2003, Tilia *et al.*, 2019).

Hasta ahora se ha identificado la organización de microtúbulos en ovocitos bovinos inmaduros, madurados *in vitro* y fertilizados (Albarricín *et al.*, 2005) y cabras (Velilla *et al.*, 2005) por medio de microscopía confocal e inmunofluorescencia y se ha propuesto que la función de los organelos citoplasmáticos incluido la integridad de los microtúbulos puede ser afectada por la edad del animal o por un inadecuado manejo del ovocito, provocando así una falla en la formación del pronúcleo, una incorrecta fertilización y una tasa menor del desarrollo embrionario temprano (Velilla *et al.* 2005, Tilia *et al.*, 2019, Gu *et al.*, 2020).

Tilia *et al.*, en el 2019 encontraron una fuerte asociación entre la integridad del huso meiótico de ovocitos humanos madurados *in vitro* con la fertilización, y la división embrionaria durante los 3 primeros días de desarrollo, además una morfología normal de los microtúbulos en el ovocito se asoció positivamente con el desarrollo de blastocistos de mejor calidad en comparación con ovocitos que presentaron microtúbulos anormales, irregulares, no bien definidos o aquellos ausentes, incluso después de controlar factores como la edad de la donadora o la etapa de desarrollo embrionario evaluado.

Estudios previos han evaluado el efecto de la vitrificación de ovocitos sobre los microtúbulos y cromosomas de humanos (Gu *et al.*, 2020), bovinos (Morató *et al.*, 2008, Wahid *et al.*, 2012, Chasombat *et al.*, 2015, Chaves *et al.*, 2017), porcinos (Rojas *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2006) y ratones (Chen *et al.*, 2001, Tamura *et al.*, 2013). Hasta donde sabemos no se ha reportado el estudio de la conformación de microtúbulos y cromosomas en ovocitos caprinos madurados *in vitro* y vitrificados.

Chaves *et al.*, en el (2017) encontraron que la exposición al crioprotector afecta significativamente la conformación tanto de cromosomas como de los microtúbulos

en ovocitos bovinos madurados in vitro y vitrificados de hasta un 50% en comparación con el grupo control en condiciones similares a las nuestras. De la misma manera las tasas de división, obtención de blastocistos y eclosión se vieron significativamente afectadas por el procedimiento experimental tanto de exposición a crioprotectores y vitrificación. Nuestros resultados muestran un daño significativo en la conformación de cromosomas y microtúbulos después de la vitrificación, lo cual podría estar relacionado con la baja tasa de división embrionaria mostrada después del calentamiento (21.3%) con respecto al control (54.7%). Resultados similares han sido observados en diferentes estudios en donde los porcentajes de división embrionaria en caprinos obtenidos antes y después de la vitrificación se reduce de manera importante, 56.7% vs 46.23% (Menéndez-Blanco *et al.*, 2020), 71.8% vs 57.9% (Quan *et al.*, 2014), 80.9% vs 29.6% (Srirattana *et al.*, 2013), 17.4% vs 8% (Sharma *et al.*, 2006). Sin embargo, las condiciones experimentales de cada una de las investigaciones mencionadas son muy diferentes, ya que hasta la fecha no existe una estandarización del uso de crioprotectores ni de la técnica de vitrificación en la especie caprina y los resultados aún son inconsistentes.

La toxicidad de los crioprotectores es otro de los problemas que presenta la técnica de vitrificación, sin embargo puede ser evitado con un tiempo óptimo de exposición a estos. Prentice *et al.*, (2011) demostró que 10 min de exposición al EG y DMSO al 7.5% en la SE es tiempo suficiente para causar toxicidad en ovocitos bovinos inmaduros. Sin embargo Fernández-Reyes *et al.*, en el 2012 logró obtener mórulas a partir de ovocitos ovinos y porcinos vitrificados expuestos en una SE al 4% de EG durante 15 min. similares resultados fueron obtenidos por Begin *et al.*, en el 2003 sometiendo ovocitos caprinos vitrificados a una solución de equilibrio de EG y DMSO al 10% durante 15 min, obteniendo 58% de división embrionaria por activación partenogénica, bajando drásticamente la obtención de mórulas hasta un 3%. Diferentes estudios han demostrado bajas tasas de fertilización de entre 8 y 16% (Sharma *et al.*, 2006; Purohit *et al.*, 2012) y algunos otros reportan haber llegado al 3% en obtención de blastocistos bovinos (Chaves *et al.*, 2017) y en cabras porcentajes que van del 3.3% al 5.3% (Srirattana *et al.*, 2013; Quan *et al.*, 2014) a

partir de ovocitos madurados in vitro y vitrificados. A pesar de las investigaciones en producción de embriones caprinos in vitro a partir de ovocitos vitrificados, se ha demostrado que ésta sigue siendo afectada por diversos factores y la calidad de los embriones producidos sigue siendo inferior a la producida in vivo (Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2007).

8. Conclusión

En la literatura se describen diversos medios de maduración, vitrificación, fertilización y cultivo embrionario, sin embargo, bajo las condiciones descritas en este trabajo una gran cantidad de ovocitos caprinos madurados *in vitro* expuestos a crioprotector y vitrificados se ven afectados tanto en la distribución cromosómica como en la estructura y configuración de los microtúbulos lo que conlleva a la incapacidad de seguir dividiéndose y llegar a la formación de un embrión de buena calidad. Sin embargo, a pesar de estas alteraciones un porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* y vitrificados tuvieron división embrionaria logrando la obtención de embriones en estadio de mórula temprana. La interrupción de la integridad del embrión se asoció con alteraciones de los cromosomas y microtúbulos en los ovocitos vitrificados. Se requiere una extensa investigación acerca del mejoramiento de la técnica de vitrificación de gametos, así como de la Producción *In Vitro* de Embriones a partir de ovocitos vitrificados, ya que hasta la actualidad los resultados siguen siendo inconsistentes.

Los datos presentados en este trabajo proporcionan evidencia de que los ovocitos vitrificados no deben ser manipulados de la misma manera que ovocitos frescos. En cierta medida un ovocito madurado *in vitro* y vitrificado presenta una ultraestructura dañada y sin duda es deber del embriólogo tener en consideración estas implicaciones para desarrollar un protocolo más optimizado de vitrificación y desarrollo embrionario.

A pesar de todo esto, la tasa de éxito actual en la criopreservación de ovocitos aún es alentadora y aumentar la eficiencia de los métodos de vitrificación es un objetivo difícil pero realista.

En conclusión, el efecto deletéreo durante la vitrificación de ovocitos caprinos madurados *in vitro* afecta las características morfológicas de los cromosomas y su distribución en la placa metafásica, de la misma manera la vitrificación tiene un efecto negativo sobre la estructura del huso meiótico de ovocitos caprinos vitrificados en metafase II.

La vitrificación de ovocitos caprinos y la PIVE es todavía un área muy amplia de investigación debido a que uno de los más grandes desafíos es establecer un procedimiento de vitrificación accesible y confiable que permita tener un banco de ovocitos, para la conservación y mejoramiento genético, así como el acercamiento a las nuevas técnicas de reproducción asistida.

9. Bibliografía

- Albarracín JL, Morató R, Rojas C, Mogas T. 2005. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology*, 63(3), 890–901. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.010>
- Aman RR, Parks JE. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod*. Jan;50(1):103-10. doi: 10.1095/biolreprod50.1.103. PMID: 8312433
- Amiridis GS., Cseh S. 2012. Assisted reproductive technologies in the productive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science* 130: 152-161
- Arav A. 2014. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81(1), 96–102.
- Arav A, Zeron Y. 1997. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by the composition and concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology* 47, 341.
- Baker TG. 1982. Oogenesis and ovulation. In *Reproduction in Mammals: Vol I, Germ Cells and Fertilization* (Austin CR & Short RV eds). Cambridge, UK. Cambridge University Press. 2:17–45.
- Baldassarre H, Karatzas CN. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science* 82–83, 255–266
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer C, Lazaris A, Karatzas CN. 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology* 57: 276-264
- Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2-to4-cell using the cryoloop (CVL) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*, 59: 1839-1850
- Bilton RJ, Moore NW. 1976. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Australian Journal of Biological Sciences*, 29:125-129

- Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41: 54-62.
- Bo GA, Mapletoft RJ. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*. 10 (3): 344-348.
- Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. 2003. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1 (14):1-12.
- Cao X, Li J, Xue H, Wang S, Zhao W, Du Z, Yang Y, Yue Z. 2017. Effect of vitrification on meiotic maturation, mitochondrial distribution and glutathione synthesis in immature silver fox cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, 91, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016>
- Carroll J, Depypere H, Matthews CD. 1990. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*; 90: 547–553.
- Castro de Pardo C. 2006. Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba del MTT. Bogotá, Colombia.
- Catalá MG, 2012. Assessment of prepubertal sheep oocyte competence for in vitro embryo production by the Brilliant Cresyl Blue Test. Doctoral thesis. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Chasombat J, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. 2015. Pretreatment of *in vitro* matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. *Cryobiology* 71: 216-223.
- Chaves DF, Corbin E, Almiñana C, Locatelli Y, Souza-Fabjan JMG, Bhat MH, Freitas VJF, Mermillod P. 2017. Vitrification of immature and in vitro matured bovine cumulus-oocyte complexes: Effects on oocyte structure and embryo development,

Livestock Science, Volume 199: 50-56, ISSN 1871-1413,
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.02.022>.

- Chen SU, Lien YL, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum. Reprod.* 16, 2350–2356.
- Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, Rubalcaba CLA, García AMI, Montoya Sarmiento JEM. 2008. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, Volume 16, Issue 5, Pages 608-610, ISSN 1472-6483, [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60471-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60471-3).
- Cognié Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51:105-116
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology* 59: 171-188.
- Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafriiri A. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 187:153–159.
- Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103:293-298.
- Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botté F, Martínez EA. 2004. *In vitro* development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology*, 62: 1144-1152.
- Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. 2000. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology*; 53: 1295–1303.
- Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000. High development rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 63: 513-518

- Ducibella T, Duffy P, Buetow J. 1994. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biology of Reproduction*. 50:467-73.
- Ducolomb RY, Romo GS, Balcázar SJ, Rodarte CL, Casas HE, Fragoso GG, Sciutto CE, Betancourt RM. 2005. Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro* *Técnica Pecuaria en México*, 43,3: 425-432
- Eppig JJ, O'Brien MJ. 1994. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction* 54: 191-207.
- Eppig JJ. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 13:569-74.
- Eppig JJ. 1993. Regulation of mammalian oocytes maturation. In: *The ovary*. Adashi, E.Y. y Leung, P.C.K., eds., Raven Press, Nueva York, 185-208.
- Fahy GM, Levy DI, Ali SE. 1987. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* 24:196-213
- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* 78: 203–216.
- Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195:327-336.
- Fair T, Lonergan L, Boland M. 2011. The acquisition of developmental competence in bovine oocytes. *Theriogenology* 25:1.
- Fan Z, Yang M, Regouski M, Polejaeva IA. 2017. Effects of three different media on *in vitro* maturation and development, intracellular glutathione and reactive oxygen species levels, and maternal gene expression of abattoir-derived goat oocytes, *Small Ruminant Research*, Volume 147: 106-114, ISSN 0921-4488, <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.12.041>.

- Fernandez-Reyez F, Ducolomb Y, Romo S, Casas E, Salazar Z, Betancourt M, 2012. Viability, maturation and embryo development *in vitro* of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices, *Cryobiology* 64: 261– 266.
- Fernández RF. 2012 Tesis Doctoral: Efecto de la vitrificación en la viabilidad, maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos inmaduros de porcino y ovino vitrificados en diferentes recipientes. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Fieni F, Beckers JP, Buggin M, Bruyas JF, Perrin J, Daubie M, Tainturier D. 1995. Evaluation of cryopreservation techniques for goat embryos. *Reproduction Nutrition Development*, 35: 367–373.
- Figuereido JR, Rodriguez APR, Amorin CA. 2002. Manipulacion de ovocitos incluidos em folículos ováricos preantrais. *Biotécnicas Aplicadas á Reproducao Animal*. Sao Paulo. Livraria Valera 1a. Edición pp 195-226.
- Fuchinoue K, Fukunaga N, Chiba S, Nakajo Y, Yagi A, Kyono K. 2004. Freezing of Human Immature Oocytes Using Cryoloops with Taxol in the Vitrification Solution. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 21(5): 307-309.
- Fuku E, Xia L, Downey BR. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 32(2), 139–156. <https://doi.org/10.1006/cryo.1995.1013>
- García JI, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. 2011. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program, *Human Reproduction*, Volume 26, Issue 4: 782–790, <https://doi.org/10.1093/humrep/der008>.
- Gardner DK. 2008. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reproduction, fertility, and development*, 20(1), 9–18. <https://doi.org/10.1071/rd07160>
- Gasparri B, Attanasio L, De Rosa A, Monaco E, Di Palo R, Campanile G., 2007. Criopreservación of *in vitro* madured buffalo (*Bubalus Bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. *Animal Reproduction Science* 98: 335- 342.

- Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. 2005. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Human Reproduction*; 12: 3385–3389.
- Gibbons A, Cueto M. 2013. *Manual de Transferencia de Embriones Ovinos y Caprinos*. INTA. Argentina. Segunda Edición. 20-23.
- Goncalves PBD, Visintin JA, Oliveira MAL, Montanger MM, Costa LFS. 2002. *Produção in vitro de embriões*. *Biotécnicas Aplicadas á Reproducao Animal*. Sao Paulo. Livraria Valera. 195-226.
- Gu, R.H., Li, Z.C., Lang, J.W., Chen, H., Feng, Y., Guo, S., Fu, J., Sun, X.X., Sun, Y.J. (2020) Vitrification of In vitro-matured Oocytes: Effects of Meiotic Spindle Morphology on Clinical Outcome. *Reprod Dev Med* 4:18-24. DOI:10.4103/2096-2924.281854
- Holtz W. 2005. Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Ruminant Research* 60: 95–110
- Hurtt A, Landim-Alvatenga F, Seidel GE, Squires EL. 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethyleneglycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 54: 119-128.
- Hyttel P, Vajta G, Callesen H. 2000. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. *Mol Reprod Dev*; 56(1):80-88. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200005)56:1<80::AID-MRD10>3.0.CO;2-U
- Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch J. 2001. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo Lett*; 22: 157–162.eni
- Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology*; 3: 250–253.
- Izquierdo MD, Villamediana P, Paramio MT. 1999. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*, 52:647-861

- Jiménez-Macedo AR, Izquierdo D, Anguita B, Paramio MT. 2005. Comparison between intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization employing oocytes derived from prepubertal goats. *Theriogenology*, 64: 1249-1262
- Josefsberg LB, Galiani D, Lazar S, Kaufman O, Seger R, Dekel N. 2003. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biol Reprod.* 68(4):1282-90.
- Khatun M, Bhuiyan MM, Ahmed JU, Haque A, Rahman MB, Shamsuddin M. 2011. In vitro maturation and fertilization of prepubertal and pubertal black Bengal goat oocytes. *J Vet Sci.* 12(1):75-82. doi:10.4142/jvs.2011.12.1.75 55
- Kharche SD, Sharma GT, Majumdar AC. 2005. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes vitrified at the germinal vesicle stage, *Small Ruminant Research*, Volume 57, Issue 1: 81-84. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.03.003>.
- Katska-Ksiazkiewicz L, Ryńska B, Gajda B, Smorag Z. 2004. Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of in vitro embryo production in goats. *Theriogenology.* 2004;62(3-4):576-586. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.11.007
- Katska-Ksiazkiewicz L, Opiela J, Ryńska B. 2007. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology*, 68(5), 736–744. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.016>
- Keskintepe L, Darwish GM, Kenimer AT, Bmckett BG. 1994. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 42: 527-535.
- Koeman J, Keefer CL, Baldassarre H, Downey BR. 2003. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* 60: 879–889
- Kubelka M, Motlik J, Fulka JJ, Prochazka R, Rimkevikova Z, Fulka J. 1998. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and paminobenzamidine block. *Gamete Research.* 19:423-431.

- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C. 1999. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum Reprod*; 14:3077-3079.
- Kuwayama M, Kato O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction Genet*; 17: 477 (abstract).
- Lazcano J, Maldonado I, López P, Dabbah J, Moreno D, Bermúdez A, Gaytán J. 2010. Estudio clínico comparativo. Resultado de la vitrificación y desvitrificación de embriones humanos con dos tipos de sistemas abiertos: Cryotop vs Cryolock. *Rev Mex Med Repro.*;2.3(3):79-83.
- Le Gal F, Ba G, Vallet JC, Leboeuf B. 1993. In vivo and *in vitro* survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. *Theriogenology* 40: 771–777.
- Leibo SP. 2008. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology* 69: 37–47.
- Liu, Z., Zhang, G., Deng, M., Yang, H., Pang, J., Cai, Y., Wan, Y., Wang, F. 2020. Inhibition of lysine-specific histone demethylase 1A results in meiotic aberration during oocyte maturation in vitro in goats. *Theriogenology*, 143, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.12.011>
- Martino AN, Songsasen S, Leibo SP. 1996. Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059–1069.
- Mayes MA, Sirard MA. 2001. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology* 55:911-922.
- Memili E, Peddinti D, Shack LA, Nanduri B, McCarthy F, Sagirkaya H, Burgess SC. 2007. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction*. 133(6):1107-20.
- Menéndez-Blanco I., Soto-Heras, S., Catalá, M.G., Piras A.R., Izquierdo, D., Paramio, M.T. (2020). Effect of vitrification of in vitro matured prepubertal goat oocytes on

embryo development after parthenogenic activation and intracytoplasmic sperm injection. *Cryobiology* 93: 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.02.011>

Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. 2008. Embryo development and structural analysis of *in vitro* matured bovine oocytes vitrified in flexipet denuding pipettes, *Theriogenology*, Volume 70, Issue 9: 1536-1543, ISSN 0093-691X, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.002>.

Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. 2008^b. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology*. 57(2):137-141. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.07.003

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: aplication to proliferation and toxicity assays. *Journal of Inmunology Methods*; 65:55-63.

Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, Singhal DK, Boateng, S, Saugandhika S, Kumar S, De S, Guha SK, Malakar D. 2014. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracelular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Genet*. 31(2):229-239. doi:10.1007/s10815-013-0116-9

Mullen SF, Fahy GM, 2012. A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs, and sheep, *Theriogenology* 78, 1709–1719.

Muñoz GR. 2008. Fisiología del gameto femenino. *Desarrollo Sostenible de Ganaderia doble propósito*. Cap 41: 505-514.

Murakami M, Otoi T, Karja NW, Wongsrikaeo P, Agung B, Suzuki T. 2004. Blastocyst derived from *in vitro* fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. *Cryobiology*; 48: 341–348

Nowshari MA, Holtz W. 1995. *In vitro* culture of goat morulae to blastocysts before freezing. *Theriogenology* 44: 983-988

Nowshari MA, Holtz W. 1993. Transfer of split goat embryos without zonae pellucidae either fresh or after freezing. *Journal of Animal Science* 71: 3403–3408

- Palomo MJ, Izquierdo MD, Morgas T, Paramio MT. 1999. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 51:927-940.
- Palmerini MG, Antinori M, Maione M, Cerusico F, Versaci C, Nottola SA, Macchiarelli G, Khalili MA, Antinori S. 2014. Ultrastructure of Immature and Mature Human Oocytes after Cryotop Vitrification. *Journal of Reproduction and Development*. Vol. 60 (2014), No. 6 pp. 411-420. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-027>
- Palomo MJ, Izquierdo MD, Morgas T, Paramio MT. 1999. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 51:927-940.
- Paramio MT. 2010. In vivo and *in vitro* embryo production in goats. *Small Ruminant Research*, 89: 144–148.
- Pereira RJ, Ayoub M, Holtz W. 1995. Birth of live goat kids after *in vitro* maturation, fertilization and culture. *Reproduction in Domestic Animals* 30: 299–300.
- Pradeep MA, Jagadeesh J, De AK, Kaushik JK, Malakar D, Kumar S, Dang AK, Das SK, Mohanty AK. 2011. Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on in vitro embryo development, *Theriogenology*. Volume 75, Issue 6: 1005-1015, ISSN 0093-691X, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.07>.
- Pichardo J, Ortiz F, Rodríguez J, Ducolomb Y, Reyes F, Betancourt M, Casas E, Heuze Y, Kjelland M, Romo S. 2016. Use of IVF and ET in Mexican Criollo Sheep (*Ovis aries*): Immediate and Delayed Embryo Transfers. *Advances in Reproduction Science*.4:8-16
- Prentice JR, Singh J, Dochi O, Anzar M. 2011. Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology*, 75(4), 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.027>
- Prentice-Biensch, J. R., Singh, J., Mapletoft, R. J., & Anzar, M. 2012. Vitrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: effects of cryoprotectants, the vitrification procedure and warming time on cleavage and embryo development. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 10, 73. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-73>

- Puls-Kleingeld M, Nowshari MA, Holtz W. 1992. Cryopreservation of goat embryos by the one-step or three-step equilibration procedure. In: Lokeshwar, R.R. (Ed.), Recent Advances in Goat Production. Nutan Printers, New Delhi, 1388–1391.
- Purohit GN, Meena H, Solanki K. 2012. Effects of Vitrification on Immature and in vitro Matured, Denuded and Cumulus Compact Goat Oocytes and Their Subsequent Fertilization. *J Reprod Infertil.* 13(1):53-9. PMID: 23926524; PMCID: PMC3719371.
- Quan GB, Li WJ, Lan ZG, Wu SS, Shao QY, Hong QH. 2014. The effects of meiotic stage on viability and developmental capability of goat oocytes vitrified by the Cryoloop method. *Small Ruminant Research.* Volume 116, Issue 1: 32-36, <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.10.005>.
- Rall W, Fahy G. 1985. Ice free-cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*; 313:573-575.
- Rao BS, Mahesh YU, Charan KV, Suman K, Sekhar N, Shivaji S. 2012. Effect of vitrification on meiotic maturation and expression of genes in immature goat cumulus oocyte complexes. *Cryobiology.* Jun;64(3):176-84. doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.01.005. Epub 2012 Jan 18. PMID: 22280956.
- Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, *et al.* 2003. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod*;18:1289–93.
- Rodríguez-Dorta N, Cognié Y, González F, Poulin N, Guiton F, Touzé JL, Baril G, Cabrera F, Álamo D, Batista M, Gracia A, Mermillod P. 2007. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos. *Theriogenology* 68: 908–913.
- Rodríguez VJ, Ortega VV, Canteras JM, 1997. Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad *in vitro* de líneas de melanoma. *Patología*, Vol.30, N 1:18-27

- Rojas C, Palomo MJ, Albarracin JL, Mogas T, 2004. Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments, *Cryobiology* 49: 211–220.
- Romaguera R, Casanovas A, Morató R, Izquierdo D, Catalá M, Jimenez-Macedo AR, Mogas T, Paramio MT. 2010. Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats. *Theriogenology*, Volume 74, Issue 3: 364-373, ISSN 0093-691X, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.019>.
- Romaguera R, Morató R, Jiménez-Macedo AR, Catalá M, Roura M, Paramio MT, Palomo MJ, Mogas T, Izquierdo D. 2010. Oocyte secreted factors improve embryo developmental competence of COCs from small follicles in prepubertal goats. *Theriogenology*.;74 (6):1050-1059. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.04.035
- Sadler TW. 2001. *Embriología Médica*. Ed. Panamericana. Octava edición.
- Salomone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, Duby RT. 2001. Biochemical and Developmental Evidence That Ooplasmic Maturation of Prepubertal Bovine Oocytes Is Compromised. *Biology of Reproduction*. 64:1761–1768.
- Samaké S, Amoah EA, Mobini S, Gazal O, Gelaye S. 1999. In vitro fertilization of goat oocytes during the non-breeding season, *Small Ruminant Research*, Volume 35, Issue 1: 49-54 [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(99\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00065-6).
- Santa Cruz PC, Huanca LW, Condori PR, Ampuero BA. 2014. Uso de Macromoléculas sobre la Tasa de Maduración y Desarrollo Embrionario in vitro de Ovocitos Bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4), 487-493. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10799> 60
- Saunders KM., Parks JE. 1999. Effects of Cryopreservation Procedures on the Cytology and Fertilization Rate of In Vitro-Matured Bovine Oocytes, *Biology of Reproduction*, Volume 61, Issue 1: 178–187, <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.1.178>

- Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC. 1998. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Developmental Biology*. 151: 541-551.
- Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancout MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly SA, Monget P, Monniaux D, Viñoles C, Webb R. 2011. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 23: 444-467.
- Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. 1993. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Animal Reproduction Science*. 31: 49-60.
- Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. 1993. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Animal Reproduction Science*. 31: 49-60.
- Sharma GT, Kharche SD, Majumdar AC. 2006. Vitrification of in vitro matured goat oocytes and the effect on in vitro fertilization, *Small Ruminant Research*, Volume 64, Issues 1–2: 82-86. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.04.001>.
- Sirard MA. 1989. Temporary inhibition of *in vitro* meiotic resumption by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. *Theriogenology*; 31: 257.
- Somfai T, Kikuchi K, Nagai T, 2012. Factors affecting cryopreservation of porcine oocytes, *Journal of Reproduction and Development*. 58: 17–24.
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T, Kikuchi K. 2007. Developmental competence of *in vitro*-fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology*; 55: 115–126.
- Souza-Fabjan JM, Locatelli Y, Duffard N, Corbin E, Touzé JL, Perreau C, Beckers JF, Freitas VJ, Mermillod P. 2014. In vitro embryo production in goats: Slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up-derived oocytes have different kinetics and

- requirements regarding maturation media. *Theriogenology*, 81(8), 1021–1031. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.023>
- Souza-Fabjan JM, Locatelli Y, Duffard N, Corbin E, Batista RI, de Figueirêdo Freitas VJ, Beckers JF, Mermillod P. 2016. Intrinsic quality of goat oocytes already found denuded at collection for in vitro embryo production. *Theriogenology*, 86(8), 1989–1998. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.021>
- Sripunya N, Somfa T, Inaba Y, Nagai T, Ima K, Parnpa R. 2010. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 56: 112.125.
- Srirattana K, Sripunya N, Sangmalee A, Imsoonthornruksa S, Liang Y, Ketudat-Cairns M, Parnpai R. 2013. Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation, *Small Ruminant Research*, Volume 112, Issues 1–3: 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.10.011>.
- Suss U, Wuthrich K, Stranzinger G. 1988. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. *Biology of Reproduction* 38: 871-880.
- Tamura AN, Huang TT, Marikawa Y. (2013) Impact of vitrification on the meiotic spindle and components of the microtubule-organizing center in mouse mature oocytes. *Biol Reprod* 89:112. doi: 10.1095/biolreprod.113.108167.
- Teteltitla SM, 2014. Evaluación de la viabilidad, maduración y efecto genotóxico en ovocitos y células del cúmulo porcinos expuestos a sulfonato de perfluorooctano (pfos) *in vitro*. Tesis Maestría. Uam-Iztapalapa.
- Tilia L, Chapman M, Kilani S, Cooke S, Venetis C. 2019. Oocyte meiotic spindle morphology is a predictive marker of blastocyst ploidy - a prospective cohort study. *Fertility and Sterility*. 113, (1):105–113. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.070>
- Tsafriiri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJ, Conti M. 1996. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and

germ cell: Studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Developmental Biology*. 78:393-402.

Traldi AS, Leboeuf B, Cognié A, Poulin N, Mermillod P. 1999. Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. *Theriogenology*, 51: 175 (abstract).

Velilla E, Rodríguez-Gonzalez E, Vidal F, Paramio MT. 2005. Microtubule and microfilament organization in immature, *in vitro* matured and *in vitro* fertilized prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 13(2):155-165. doi:10.1017/s0967199405003229

Yan CL, Fu XW, Zhou GB, Zhao XM, Zuo L, Zhu SE. 2010. Mitochondrial behaviors in vitrified mouse oocyte and its parthenogenetic embryo: effect of Taxol pretreatment and relationship to competence. *Fertility and Sterility*. 93 (3): 959-966.

Yang M, Hall J, Fan Z, Regouski M, Meng Q, Rutigliano HM, Stott R, Rood KA, Panter KE, Polejaeva IA. 2016. Oocytes from small and large follicles exhibit similar development competence following goat cloning despite their differences in meiotic and cytoplasmic maturation. *Theriogenology*. 86(9):2302-2311. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.07.026

Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAI, Brackett BG. 1991. *In vitro* fertilization of goat oocyte. *Biology of Reproduction* 1991, 44: 1177-1182.

Wahid H, Thein M, El-Hafez EA, Abas MO, Azam KM, Fauziah O, Rosnina Y, Hajarian H. 2012. Structural changes in cattle immature oocytes subjected to slow freezing and vitrification. *Pak.Vet. J.* 32, 188–192.

Wang B, Baldassarre H, Tao T, Gauthier M, Neveu N, Zhou JF, Leduc M, Duguay F, Bilodeau AS, Lazaris A, Keefer C, Karatzas. 2002. Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of *in vitro* derived zygotes. *Mol Reprod Dev.*;63(4):437-443. doi:10.1002/mrd.10199

Whitaker M. 1996. Control of Meiotic Arrest. *Review of Reproduction*. 1:127-135.

Wu, C., Rui, R., Dai, J., Zhang, C., Ju, S., Xie, B., 2006. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol. Reprod.Dev.* 73, 1454–1462.

Zhang J, Wei Q, Cai J, Zhao X, Ma B. 2015. Effect of C-Type Natriuretic Peptide on Maturation and Developmental Competence of Goat Oocytes Matured *In Vitro*. *PLoS ONE* 10(7): e0132318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132318>

ANEXO I. PREPARACIÓN y SUPLEMENTACION DE MEDIOS.

Preparación de la tinción de **MTT**.

Se prepara una solución 0.005g (0.5mg) de MTT/ml de PBS (Teteltila, 2014).

Preparación de **Orceína Acética**.

Disolver dos gramos de orceína en 55 cm³ de ácido acético glacial. Calentar hasta ebullición y mantener ésta durante 10 minutos. Dejar enfriar y añadir agua destilada hasta completar 100 cm³. Trás 12 horas de reposo, filtrar. La solución de trabajo se obtiene añadiendo una parte de HCl 1N por cada 9 partes de la solución anterior.

Preparación de la Tinción **Hoechst 33342**.

Se prepara una solución de Etanol al 100% y se le adicionan 25µg/ml de bisbenzímide Hoechst 33342. Para teñir los ovocitos, estos se transfieren a un microtubo con 500 µl de la solución y se almacena a 4°C, durante toda la noche, protegidos de la luz (Thouas *et al.*, 2001). La lectura se realiza en un microscopio de fluorescencia con una lámpara ultravioleta y un filtro de excitación de 460 nm.

Preparación de la tinción **FDA**.

Se prepara una solución 1mg/ml de Acetona. Se observa en un microscopio de fluorescencia con un filtro BP de 450-490 nm (Boender, 1984).

También se puede preparar de la siguiente manera:

2.5 ug/ml de FDA en PBS + 5mg/ml de BSA, se sumerge en la solución durante 2 min. Esto con la finalidad de poder seguir utilizando las células posterior a la tinción (Chasombat *et al.*, 2015).

Todos los medios deberán permanecer con un pH dentro de un rango de 7.2 – 7.4 y una Osmolaridad de 270 – 285 mOsm/L. al menos que se indique lo contrario.

MEDIO BASE (MB)

	p/10 ml	p/20ml
TCM 199 H	9 ml	16 ml
SFB (Suero Fetal Bovino) = 10%	1 ml	2 ml
BSA (Albumina Sérica Bovina Fracción V libre de ácidos grasos)* = .4%	0.04 gm.	0.08 gm.

*El Medio Base utiliza SFB o en su caso puede ser sustituido con BSA, ya que ambos proveen fuente energética, proteica y como factor surfactante. Y a su vez el BSA funciona como una sustancia Quelante.

SOLUCIÓN DE EQUILIBRIO (SE)

	p/10 ml
Etilen Glicol (EG) 7.5%	0.75 ml.
MB	9.25 ml.

SOLUCIÓN VITRIFICANTE (SV)

	p/10 ml
Etilen Glicol (EG) 15%	1.5 ml
Polivinil Pirrolidona 5%	0.5 ml
Sucrosa 0.4 Molar	1.5133 gr.
MB	7.48 ml.

SOLUCIONES DE CALENTAMIENTO (SC)

Se realizan 3 soluciones de calentamiento utilizando el MB antes descrito y agregando **Sucrosa** en concentraciones decrecientes.

SC 1	MB + 0.3 Molar
SC 2	MB + 0.2 Molar
SC 3	MB + 0.1 Molar
SC 4	MB S/sucrosa

MEDIO MADURACIÓN (MM)

Componente	p/ 5ml.
TCM 199 con sales de Earle, L/Glutamina y Bicarbonato	4900 ul
BSA (0.3 mg/ml)	1.5 mg
FSH	25 ul
LH	25 ul
Piruvato de Sodio (0.32mM)	0.352 mg
Penicilina / Estreptomina 1%	50 ul

Medio de Fertilización (MF): Medio TALP con 0.3 mg/ml de Glutación y 1 µg/ml de Hipotaurina.

Medio de Cultivo para Embriones (MCE): Medio de SOF más 3mg/ml de BSA.

ANEXO II. TRABAJOS GENERADOS A PARTIR DE ESTA TESIS.

Artículo publicado.

González-Silvestry, F. B., Chirino, Y. I., Delgado-Buenrostro, N. L., Medina-Reyes, E.I., Kjelland, M. E., Parra-Forero, L.Y., Hernández-Ochoa, I., López-Baños, B., Delgado-Tiburcio, G.A., & Romo, S. (2022). Evaluation of chromosome organization and microtubule arrangement in goat (*Capra aegragus*) oocytes after vitrification, in vitro maturation and fertilization, and early embryo development. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i11.2420>

Capítulo de Libro.

González Silvestry F. B., Romo García S. (2021). Producción de embriones caprinos In Vitro: uso de ovocitos vitrificados. En *Reproducción Asistida y conservación de mamíferos (28-41)*. Universidad Autónoma Metropolitana, México: Ediciones del Lirio. ISBN 978-607-87-85-27-8.

Tesis de licenciatura.

Torres Resillas, S.P. (2017). Efecto de la temperatura y tiempo de transporte, sobre la viabilidad de ovocitos caprinos vitrificados. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Estado de México, México.

Participación en congresos nacionales e internacionales.

XL Congreso Nacional e Internacional de Buiatría. Torres RSP, Romo GS, López BB, González SFB. (2016). Efecto de la temperatura y tiempo de transporte, sobre la viabilidad de ovocitos caprinos vitrificados. *Zacatecas, Zacatecas*, Pp. 243.

Primeras conferencias internacionales de biotecnologías reproductivas en bovinos y caprinos. Ponencia "Producción de embriones caprinos in vitro". Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 5 de marzo de 2018.

Primer simposio Una visión actual a la reproducción asistida y a la conservación de mamíferos. Ponencia “FIV en Caprinos: uso de ovocitos vitrificados”. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Ciudad de México, México. 23 al 23 de enero 2019.

Ponencia Virtual “Producción de embriones caprinos in vitro: Uso de Ovocitos Vitrificados”. Primer ciclo de conferencias internacionales en caprinos. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria. Huamanga, Perú. 23 y 24 de julio de 2020.

Conferencia “Producción de embriones in vitro a partir de ovocitos vitrificados” Tópicos selectos del Módulo de Enfermedades sistémicas y Toxicológicas de la Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México. 03 de septiembre de 2020.

Conferencia: “Bases de la criopreservación de ovocitos y embriones”. Tópicos selectos del Módulo de Enfermedades sistémicas y Toxicológicas de la Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México. 17 de septiembre de 2020.

Ponencia “Vitrificación de embriones caprinos” Caprifesc 2021. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México. 15 de enero de 2021.

Ponencia: “Criopreservación de ovocitos caprinos”. “XII Jornadas de Reproducción Animal”, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. 18 de Octubre de 2021.

Ponencia: “Criopreservación de ovocitos caprinos”. 2° Simposio “Una visión actual a la reproducción y a la conservación de mamíferos”. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. 28 de enero de 2022.