

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Casa abierta al tiempo

VIABILIDAD, MADURACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*
DE OVOCITOS INMADUROS DE PORCINO Y OVINO, VITRIFICADOS EN
DIFERENTES RECIPIENTES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

MPA. FILIBERTO FERNÁNDEZ REYES

DIRECTOR

DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

ASESORES

DRA. YVONNE DUCOLOMB RAMÍREZ
DR. SALVADOR ROMO GARCÍA

México, D.F., Julio de 2012.

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-20031DPTNNN0020. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 193211.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

VIABILIDAD, MADURACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* DE OVOCITOS INMADUROS DE PORCINO Y OVINO, VITRIFICADOS EN DIFERENTES RECIPIENTES, que presentó:

MPA. FILIBERTO FERNÁNDEZ REYES

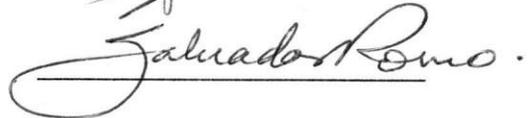
El día 9 de Julio del 2012

Sinodales:

DRA. YVONNE DUCOLOMB RAMÍREZ
PRESIDENTA



DR. SALVADOR ROMO GARCÍA
SECRETARIO



DR. EDUARDO CASAS HERNÁNDEZ
VOCAL



DR. DEMETRIO AMBRÍZ GARCÍA
VOCAL



COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. MIGUEL BETANCOURT RULE
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

ASESORES

DRA. IVONNE DUCOLOMB RAMÍREZ
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DR. SALVADOR ROMO GARCÍA
Laboratorio de Reproducción
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México

SINODALES

DR. EDUARDO CASAS HERNÁNDEZ
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DR. DEMETRIO AMBRÍZ GARCÍA
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DEDICATORIA

A mis padres Anastasia Reyes Carrasco(+) y Basilio Fernández Méndez por su infinito cariño, ternura y consejos que siempre fueron de apoyo para superarme.

A mi esposa Susana Barrera Méndez e hijo Oscar Fernández Barrera por ser partícipes de los logros obtenidos, por su amor, cariño, apoyo y comprensión.

A mis hermanos Jesús(+), Jerónimo y Andrea, por su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor: Dr. Miguel Betancourt Rule, por todo el apoyo proporcionado para la realización del presente trabajo, así como sus consejos y sugerencias para lograr mi formación académica y personal al fomentar un ambiente de cordialidad. Por tantos detalles de atención.

A mis Asesores: Dra. Ivonne Ducolomb Ramírez y Dr. Salvador Romo García, por haber compartido sus conocimientos y experiencias para poder concluir con las actividades propuestas en el presente trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Ivonne Ducolomb Ramírez, Dr. Salvador Romo García, Dr. Eduardo Casas Hernández, Dr. Demetrio Ambríz García, por las observaciones realizadas a la tesis.

Al Dr. Eduardo Casas Hernández por sus enseñanzas y apoyo para la realización de técnicas en el laboratorio.

A todos los que no he mencionado pero que de alguna manera me brindaron su apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

Al CONACYT por la beca proporcionada Registro N ° 193211.

A los rastros: Los Arcos y El Rojo, del estado de México, por el apoyo proporcionado.

A TODOS GRACIAS

RESUMEN

Este estudio fue diseñado para evaluar los efectos de la vitrificación en ovocitos inmaduros de porcinos y ovinos, colectados en un rastro, los cuales fueron vitrificados en recipientes con volúmenes diferentes. La viabilidad de los ovocitos fue evaluada antes y después de la vitrificación, y maduración. Inmediatamente después de la desvitrificación, el porcentaje de ovocitos porcinos viables fue de 81%, independientemente del tipo de recipiente, mientras que en el control después de la selección de ovocitos fue de 95%. La viabilidad de los ovocitos porcinos madurados después de la desvitrificación, en pajilla modificada biselada (BES) fue 6%, en pajilla abierta super estirada (SOPS) fue de 17% y en Cryotop de 4%, mientras que la viabilidad del grupo control fue de 86%. Los resultados de la viabilidad y maduración fueron similares en todos los recipientes. El desarrollo embrionario (DE) fue observado en ovocitos porcinos frescos con embriones de 2-8 células 15%, mórulas 7% y blastocistos 3%, sin embargo no se observó desarrollo embrionario en los ovocitos desvitrificados. La viabilidad de los ovocitos de ovino inmediatamente después de la desvitrificación fue de 90% en todos los recipientes, mientras que la del control después de la selección de ovocitos fue de 95%. La viabilidad después la desvitrificación y maduración fue: en BES 21%, en SOPS 30% y en Cryotop 21%, en el grupo control fue de 86%; mientras que los datos de la maduración fueron 11, 21, 34 y 70%, respectivamente. Después de la vitrificación, el mayor DE se logró en ovocitos ovinos vitrificados en SOPS, con el desarrollo de mórulas en un 17% y éste fue el único recipiente en el que se desarrollaron blastocistos. Se observó una relación directa entre la viabilidad y la integridad de filamentos de actina en ambas especies.

Palabras clave: vitrificación, porcino, ovino, ovocito-inmaduro, maduración *in vitro* y desarrollo embrionario.

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the effects of vitrification on immature porcine and ovine oocytes, collected at a slaughterhouse, by performing vitrification in devices with different volumes. Viability was evaluated both before and after vitrification and maturation. Immediately after warming, the percentage of viable pig oocytes was 81% regardless the type of device, while in the control (after oocyte selection) was 95%. The viability of matured pig oocytes after warming, vitrified in bevelled edge open straws (BES) was 6%, in super-open-pulled-straw (SOPS) was 17% and in Cryotop was 4%, while the viability of the control group was 86%. The viability and maturation results were similar with all devices. Embryo development (ED) was observed in fresh porcine oocytes with 15% 2-8 cell embryos, 7% morulae and 3% blastocysts, and non-embryo cleavage was observed in warmed oocytes. The viability of sheep oocytes immediately after warming averaged 90% in all devices, while that of the control (after oocyte selection) averaged 95%. The viability of warmed oocytes after maturation was: BES 21%, SOPS 30%, Cryotop 21% and control group 86%; while maturation values were 11, 21, 34 and 70%, respectively. After vitrification, the highest ED was achieved with ovine oocytes vitrified in SOPS, with 17% morulae development and it was the only device in which blastocysts developed. A direct relationship was observed between viability and actin filament integrity in both species.

Keywords: vitrification, porcine, ovine, immature-oocyte, in vitro maturation, embryo development.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- ANTECEDENTES	2
2.1 Morfología y función de los folículos ováricos.....	2
2.1.1 Morfología del folículo.....	2
2.1.2 Formación del folículo.....	4
2.1.3 Función folicular.....	5
2.1.4 Ovogénesis.....	8
2.1.5 Maduración del folículo.....	10
2.1.6 Mecanismos hormonales de la ovulación.....	15
2.1.7 El proceso de ovulación.....	16
2.2 Fertilización <i>in vitro</i>	21
2.3 Estudios de vitrificación de ovocitos en animales domésticos....	23
2.4 Crioprotectores.....	27
2.4.1 Tipos de crioprotectores.....	27
2.4.2 Mecanismos de acción de los crioprotectores.....	28
2.5 Método de vitrificación.....	31
2.6 Sensibilidad de las células a la vitrificación.....	32
2.7 Tipos de recipientes utilizados en la vitrificación.....	34
2.8 Tiempo en que se realiza la vitrificación.....	35
2.9 La vitrificación de ovocitos porcinos.....	36
2.10 La vitrificación de ovocitos de ovino.....	38
2.11 Tratamientos después de la vitrificación.....	39
2.11.1 Desvitrificación.....	39
2.11.2 Maduración.....	40
2.11.3 Fertilización.....	40
III.- JUSTIFICACIÓN	41
IV.- HIPÓTESIS	43
4.1.- HIPÓTESIS GENERAL.....	43
4.2.- HIPÓTESIS PARTICULARES.....	43
V.- OBJETIVO GENERAL	45
VI.- OBJETIVOS PARTICULARES	45
VII.- DISEÑO EXPERIMENTAL	46
VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS	49
8.1 Colección de Ovocitos.....	49
8.2 Vitrificación.....	50
8.3 Desvitrificación de Ovocitos.....	52
8.4 Maduración de Ovocitos.....	52
8.5 Fertilización <i>in vitro</i>	53
8.6 Cultivo de Embriones.....	55
8.7 Evaluación de la Viabilidad de Ovocitos.....	55
8.8 Evaluación de la Maduración y Fertilización.....	56
8.9 Evaluación del Desarrollo Embrionario.....	57
8.10 Evaluación del citoesqueleto.....	58
8.11 Análisis Estadístico.....	59

IX.- RESULTADOS.....	60
X.- DISCUSIÓN.....	66
XI.- CONCLUSIONES.....	76
XII.- BIBLIOGRAFÍA.....	77
ANEXOS.....	101

I.- INTRODUCCIÓN

En la reproducción animal se están generando cambios basados en la aplicación de nuevas tecnologías con la finalidad de aumentar la capacidad reproductiva. El desarrollo de técnicas que permitan la adecuada criopreservación de gametos masculinos y femeninos en cerdos, así como en otras especies de mamíferos, es de gran importancia para la investigación y la reproducción asistida (Betancourt et al., 1993). Ya que los gametos son un recurso potencialmente valioso para la preservación del genoma y la diversidad genética, por este motivo se están desarrollando técnicas para madurar ovocitos criopreservados de diferentes especies que después de fertilizarlos *in vitro*, produzcan embriones que puedan ser transferidos a hembras receptoras para el desarrollo de las crías o bien para ser criopreservados (Byrd et al., 1997; Somfai et al., 2010). La fertilización *in vitro* puede proveer de embriones de animales valiosos en forma más económica que los obtenidos por los medios convencionales de superovulación (Wani, 2002).

El desarrollo de la criopreservación se ha traducido en logros tales como la tecnología para el almacenamiento de embriones de mamíferos como vacas, ovejas, cerdos y otras especies (Esaki et al., 2004). Sin embargo, los ovocitos siguen siendo difíciles de ser criopreservados debido a su sensibilidad a la refrigeración y congelación (Gupta et al., 2007; Gajda, 2009). La vitrificación es un procedimiento para la conservación de ovocitos y embriones en el que se disminuye la formación

de cristales de hielo, que pueden dañar los componentes morfológicos y funcionales de las células (Vajta, 2000). Además, ésta se realiza en menos tiempo que la congelación y sin el uso de equipos costosos (Albarracin et al., 2005).

II.- ANTECEDENTES

2.1 Morfología y función de los folículos ováricos

El crecimiento y maduración folicular representan una sucesión de transformaciones celulares, conjuntamente con cambios moleculares de las células del folículo ovárico (el ovocito, células de la granulosa y de la teca) regidas por varios factores intraováricos e intrafoliculares, además de señales hormonales que conducen a la secreción de andrógenos y estrógenos. Tanto el crecimiento como la diferenciación del folículo son inducidos por hormonas de las células de la teca y la granulosa (Hafez y Hafez, 2003).

2.1.1 Morfología del folículo

La morfología del folículo incluye los siguientes componentes:

Pared folicular: formada por células de la granulosa y la teca, separadas por una lámina basal constituida por células del estroma, que experimenta cambios en el

desarrollo, relacionados con la organogénesis correspondiente de una glándula endocrina y exocrina.

Células de la teca: producen andrógenos (androstenediona y testosterona) en respuesta a los niveles basales de hormona luteinizante (LH) y después de la ovulación se transforman en células luteínicas de la teca.

Células de la granulosa: rodean al ovocito y en el folículo establecen su conexión por proyecciones de la lámina basal.

Ovocito: está inmerso en las células foliculares, revestido por su corona radiada que son células de la granulosa colocadas en posición columnar y la zona pelúcida (ZP), ésta última tiene vital importancia en el proceso de fertilización. La ZP está formada por glucoproteínas y se encuentra separada del ooplasma por el espacio perivitelino, en el ooplasma se localizan los organelos propios del ovocito.

Líquido folicular: se origina principalmente por trasudación del plasma sanguíneo a través de la lámina basal del folículo y se acumula en el antro, contiene proteínas, hormonas, aminoácidos, vitaminas y minerales, los cuales tienen como función aportar nutrientes al ovocito y factores de crecimiento para que logre su maduración citoplásmica y nuclear (Hafez y Hafez, 2003). Algunos de sus componentes, como la inhibina, tienen actividad fisiológica como la inhibición de la maduración de

ovocitos y la inhibición de la unión de LH; los folículos grandes contienen un elevado porcentaje de 17β -estradiol, progesterona y ácido hialurónico; la elevada concentración de progesterona después de la oleada de LH inhibe la actividad de aromatasas localmente en el ovario y disminuye su síntesis (Hafez y Hafez, 2003).

2.1.2 Formación del folículo

Durante la foliculogénesis fetal, la proliferación y diferenciación de las células de la teca y de la granulosa causan un aumento en la capacidad de los folículos para producir estradiol (E_2) y responder a las gonadotropinas provenientes de la glándula hipófisis. El folículo de mayor tamaño se encarga de casi toda la secreción de estrógenos por el ovario durante el estro; dicha secreción disminuye con rapidez al momento del pico de secreción de LH (Hafez y Hafez, 2003).

El folículo terciario o de De Graaf es la etapa final del crecimiento folicular, que depende de patrones apropiados de secreción, concentraciones suficientes y proporciones adecuadas de hormona folículo estimulante (FSH) y LH en el suero sanguíneo, otras hormonas participantes incluyen esteroides, prostaglandinas y glucoproteínas. La hormona FSH tiene una función importante en el inicio de la formación del antro, esta gonadotropina estimula la división de las células de la granulosa y la formación del líquido folicular, además induce la sensibilidad de las

células de la granulosa hacia la LH y aumenta el número de receptores para esta última.

2.1.3 Función folicular

El ovario está formado por una corteza y una región medular, en la primera se localizan las unidades funcionales conocidas como folículos, éstos se encuentran en diferentes estadios de desarrollo y contienen a los ovocitos. El desarrollo folicular comprende tres fases:

1) Fase de crecimiento preantral; comprende la transformación del folículo primordial en secundario. El folículo primordial evoluciona a folículo primario por crecimiento y transformación cuboide de sus células pregranulosas. El ovocito primario entra en el proceso meiótico, duplica su complemento de ADN, alcanza la profase I de la meiosis y entra en un estado de detención meiótica. Las células de la granulosa del folículo primario secretan glucoproteínas que rodean al ovocito, dando lugar a la ZP y a través de ésta, las células de la granulosa envían prolongaciones citoplasmáticas hacia el ovocito para establecer la información microambiental hacia este último; primero, para que se detenga en la profase de primera división meiótica y después, para que complete su maduración y crecimiento en el momento adecuado para cada ovocito en particular. Además, las células de la granulosa establecen más adelante

comunicación intercelular entre ellas mismas (autocrina) y con las células de la teca interna (paracrina) (Velázquez, 2009).

Al proliferar las células de la granulosa de cada folículo se van diferenciando, de tal manera que las más próximas al ovocito (células del cúmulo) funcionan como alimentadoras de éste y tienen un proceso de multiplicación más activo que las distantes (murales), en cambio, éstas poseen mayores concentraciones de enzimas implicadas en la esteoidogénesis y el desarrollo posterior de receptores para LH (Velázquez, 2009).

Al proliferar las células de la granulosa en el folículo primario, se forma el folículo secundario, se diferencia la teca interna a partir de células del estroma próximas a la membrana basal y ocurre la migración del folículo hacia la médula del ovario, en donde se termina de conformar la teca externa al crecer y comprimir el estroma circundante (Velázquez, 2009).

Los folículos se clasifican en fases de la I a la VIII, con los criterios histológicos siguientes: a) por el tamaño; b) por el número de células de la granulosa (o de capas de las mismas) en la membrana granulosa; c) por el desarrollo de la teca y d) por la posición del ovocito dentro de su cúmulo ovárico que lo rodea (Austin y Short, 1982).

2) Fase de crecimiento periantral; comprende el crecimiento del folículo secundario hasta su etapa de madurez (diámetro 0.2 a 2 mm), que abarca desde la clase I preantreal (ovocito primario): clasificado por su tamaño y número de 1 a 4 capas de células que lo rodean, hasta la fase IV antral (ovocito secundario). esta fase depende de mínimas cantidades de gonadotropinas, pero requiere tres ciclos ovulatorios para completarse (en ovino, porcino y bovino 12 a 34 días hasta 6 meses, en humano 70 días.), las células de la granulosa adquieren receptores para hormona FSH, andrógenos y E_2 , y se va formando el antro folicular al confluir diferentes espacios intergranulosos llenos de líquido, el folículo debe alcanzar su estadio de folículo secundario para ser reclutado en la siguiente fase de crecimiento (Velázquez, 2009).

3) Fase de crecimiento exponencial; esta fase depende de gonadotropinas y consta de cuatro eventos; reclutamiento, selección, dominancia y ovulación, el crecimiento es rápido y comprende la evolución de los folículos con ovocitos de la clase V a la VIII (ovocito terciario); se realiza durante la primera fase del ciclo ovárico, en la cual ocurre la selección y dominancia en la mayor parte de los ciclos de uno o varios folículos, dependiendo de la especie. El resto se elimina por el proceso de atresia (Velázquez, 2009).

2.1.4 Ovogénesis

La ovogénesis se define como la formación, el desarrollo y la maduración del gameto femenino, este proceso empieza en la vida embrionaria cuando las células germinales primordiales migran a la gónada embrionaria y se convierten en ovogonias y continúa hasta el momento de la ovulación (Velázquez, 2009). La ovulación es el proceso por medio del cual el ovocito sale del ovario en un momento apropiado para su fertilización y desarrollo embrionario, este proceso está relacionado con el crecimiento folicular que ocurre bajo el control de las hormonas gonadotrópicas de la glándula hipófisis. El proceso de ovulación también depende del funcionamiento correcto de las glándulas endocrinas que permiten un crecimiento folicular completo; este crecimiento a su vez permite que el ovocito reanude la meiosis y madure, para dar como resultado a los ovocitos secundarios que tienen sólo la mitad de los cromosomas (Austin y Short, 1982).

La división celular ya sea mitótica o meiótica, pasa a su vez por la profase, metafase, anafase y telofase. En la división meiótica, la profase se puede dividir en cinco periodos que se identifican con los nombres de: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis o periodo de la vesícula germinal (VG). En la mayoría de los mamíferos la profase meiótica se completa en las hembras hasta llegar al diploteno antes del nacimiento o poco tiempo después de éste, entonces los ovocitos entran en una prolongada fase de detención meiótica que termina un poco antes del inicio

de la ovulación con los cambios meióticos preovulatorios en el folículo de De Graaf (Austin y Short, 1982).

Las ovogonias que proliferan por división mitótica son recubiertas por una capa única de células de la granulosa y se diferencian en ovocitos primarios. Éstos entran en la profase de la primera división meiótica y permanecen en este estado hasta la pubertad, cuando son reclutados dentro del folículo en desarrollo, bajo la influencia del pico de secreción de la LH. Cuando el ovocito completa la meiosis I, expulsa el primer cuerpo polar y se convierte en ovocito secundario. El ovocito secundario continúa hasta la metafase de la segunda división meiótica, donde vuelve a detenerse en espera de la fertilización y completar la meiosis (Velázquez, 2009).

La ZP se forma en torno a los ovocitos, que están rodeados por una capa completa de células granulosas cuboidales; la ZP es impermeable a los solutos de alto peso molecular como los polisacáridos y proteínas. Las células granulosas que después se transforman en los cúmulos ováricos, son esenciales para la nutrición del ovocito una vez que se ha formado la ZP; estas células producen sustancias esenciales como ácido láctico y pirúvico (Austin y Short, 1982).

El bloqueo de la meiosis en el periodo de VG y en la metafase I se puede deber a la inmadurez de los ovocitos o a cambios en su metabolismo. Sin embargo, los cambios que los conducen a la reiniciación de la meiosis es más probable que se

deban a los niveles de las hormonas esteroideas, ya que éstas se acumulan en el líquido folicular y sus niveles aumentan con el tratamiento de LH. Los esteroides actúan más bien en las células del cúmulo y no directamente en el ovocito posiblemente por intermediarios metabólicos. Sin duda se debe considerar a los folículos como estructuras dinámicas en los que sus componentes celulares (las células de la granulosa, las del cúmulo, las de la teca y el ovocito) son interdependientes. Así es que la fase inicial del crecimiento del folículo probablemente empieza debido a la actividad de ciertos factores como la liberación de ARNm y la programación durante la vida embrionaria o fetal. El crecimiento hasta la formación de cuatro capas de células de la granulosa se considera independiente de cualquier control hormonal, mientras que el proceso después de esta fase depende de las hormonas hipofisarias. Por lo que se considera que los primeros cambios pasan en el ovocito mismo y éstos influyen para estimular los cambios en las células granulosas (Austin y Short, 1982).

2.1.5 Maduración del folículo

Inmediatamente después de que se forman los ovocitos, se rodean de una capa sencilla de células epiteliales aplanadas y se establece el folículo primordial. El crecimiento folicular comprende un cambio en la forma de las células, que se vuelven cuboidales y aumentan en número por mitosis, posteriormente los capilares sanguíneos invaden la capa fibrosa de células que rodean el folículo y forman la

capa vascular o teca interna; esta capa está rodeada por los fibroblastos de la teca externa y es la única fuente de sustancias nutritivas para la membrana granulosa y el ovocito. Después se acumula un líquido en los espacios entre las células epiteliales, por lo que ahora se dice que el folículo es vesicular. El ovario es una estructura dinámica en el que los folículos vesiculares se desarrollan constantemente a partir de los de tipo primordial, pero sólo con el establecimiento del correcto equilibrio hormonal y de los ciclos reproductores al inicio de la pubertad el proceso de crecimiento folicular puede culminar con la ovulación (Austin y Short, 1982).

Durante cada ciclo reproductor, como una consecuencia directa de la liberación de suficiente cantidad de FSH por la glándula hipófisis, algunos folículos en crecimiento son estimulados para que continúen su crecimiento y su maduración. El número de folículos que se seleccionan de esta forma, se determina por la cantidad disponible de hormona gonadotrópica. La fase hipófisis-dependiente del crecimiento folicular incluye la multiplicación ulterior en el número de células de la granulosa y también el paso de líquido a los espacios que se encuentran entre estas células. Conforme aumenta la cantidad de líquido, las cavidades crecen y se hacen confluentes para formar el antro. Se dice ahora que el folículo es del tipo de De Graaf; con la expansión ulterior del antro, el ovocito ocupa una posición lateral en el folículo y está rodeado de dos o más capas de células granulosas, la capa más interna toma una forma columnar y constituye la corona radiada o cúmulo ovárico que permanece alrededor del ovocito por un tiempo después de la ovulación. La separación de estas

células mientras el óvulo se encuentra dentro del folículo o un poco después de su salida, es un signo seguro de que hay cambios degenerativos que darán como resultado la muerte del ovocito (Austin y Short, 1982).

El crecimiento folicular es un proceso continuo, la mayoría de los folículos están en un estado latente y pasan a la fase siguiente sólo para mantener un número constante, pero se desconocen los factores que inician dicho crecimiento; quizá los primeros cambios pasan en el ovocito mismo y éstos obran como un disparador para estimular los cambios en las células de la granulosa. El principal mecanismo de control en la fase final del crecimiento del folículo y de su antro abarca una cantidad máxima de FSH en presencia de una pequeña cantidad de LH, cuya función parece ser la de asegurar la síntesis adecuada de esteroides, especialmente estrógenos. Los efectos combinados de estas hormonas determinan no sólo el número de folículos que se desarrollan hasta el tipo maduro de De Graaf que llegan a la ovulación sino también la proporción de ovocitos que degeneran (Austin y Short, 1982).

Durante todo el ciclo estral, cada ovario tiene numerosos folículos antrales en su superficie y el número que desarrollan por ciclo estral depende de factores hereditarios y ambientales (Eppig, 1993). La maduración de los ovocitos comprende dos etapas: 1) Un periodo de crecimiento y 2) Un periodo de maduración nuclear y citoplásmica, que constituye un prerrequisito para la fecundación y el posterior

desarrollo normal del embrión. El ovocito crece junto con el folículo primordial y casi alcanza su tamaño final en el momento de la formación del antro, las células internas del cúmulo cooperan activamente para lograr el crecimiento del ovocito ya que establecen contacto estrecho con la membrana celular de éste (Eppig, 1993).

La maduración nuclear consiste en el cambio que ocurre en el núcleo denominado VG de los ovocitos inmaduros que se encuentran en diploteno con núcleo reticular o dictiado, hasta la metafase de la segunda división meiótica, en la que se detiene una vez más. La meiosis se reinicia después de la oleada ovulatoria de gonadotropinas, que suprime la producción del factor inhibidor de la meiosis de las células de la granulosa, este cambio es seguido por la modificación metabólica de esas células y se reinicia la meiosis para terminar la maduración nuclear, a la vez también ocurre la maduración citoplásmica (Hafez y Hafez, 2003). La maduración meiótica de los ovocitos es acompañada por una translocación de mitocondrias de la región perinuclear durante la formación del huso meiótico, este movimiento requiere de altas concentraciones de ATP.

La maduración citoplásmica ocurre cuando se reinicia la meiosis al eliminarse el efecto de las células de la granulosa que rodean al ovocito, durante este proceso el citoplasma se prepara para la fertilización y el desarrollo embrionario. Una característica que resalta en los ovocitos en metafase II (MII) es la presencia de glutatión, el cual posiblemente evite la peroxidación, el glutatión alcanza su máximo

nivel en éstos, en tanto que los ovocitos inmaduros presentan una baja concentración de éste (Eppig, 1993). El citoplasma del ovocito contiene reservas nutritivas en forma de vitelo que es rico en lípidos, proteínas y polisacáridos que habitualmente se encuentran en estructuras denominadas plaquetas vitelinas (Alberts et al., 1996).

Las moléculas que participan en el proceso de la maduración folicular se integran en el acoplamiento metabólico entre el ovocito y las células del cúmulo, que incluyen la participación de factores no hormonales reguladores de la maduración, como AMPc y otros como el factor inhibidor de la maduración, las purinas y los glicosaminoglicanos (Rosales y Rosado, 1989).

Existen numerosas uniones comunicantes entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean, éstas disminuyen lentamente hasta desaparecer al aproximarse a la ovulación. Las uniones comunicantes constituyen canales intercelulares a través de los cuales pueden pasar pequeñas moléculas de una célula a otra, dando lugar al acoplamiento metabólico o cooperación fisiológica entre las células. Mediante este proceso el ovocito recibe de las células foliculares que lo rodean nutrimentos y sustancias reguladoras del crecimiento y arresto meiótico. Las uniones comunicantes permiten el paso del AMPc de las células foliculares al ovocito, inhibiendo su maduración. Además se ha postulado que la meiosis se reinicia al interrumpir la transferencia directa de AMPc al ovocito, por el efecto que tienen las

gonadotropinas sobre las uniones comunicantes (Rosales y Rosado, 1989). Las uniones comunicantes en los complejos ovocitos células cúmulo (COCs) de ovocitos son importantes en la reanudación de la meiosis (Sato y Yokoo, 2005).

2.1.6 Mecanismos hormonales de la ovulación

La oleada preovulatoria de gonadotropinas inicialmente induce un aumento inmediato y temporal en las concentraciones de esteroides debido a un aumento en la secreción de progesterona y progestinas relacionadas. Más tarde, la secreción de estradiol y prostaglandina F_2 (PGF_2) también aumenta. La inhibición de la síntesis de prostaglandina o de esteroides impiden la ovulación.

El aumento en la secreción de esteroides y el cambio en la relación estradiol-progesterona que siguen a la oleada de gonadotropinas se detectan fácilmente en el líquido folicular. La inhibición de la síntesis de progesterona impide la ovulación, cuya función es estimular la actividad de colagenasa en la pared folicular.

El aumento de las concentraciones de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) y PGE_2 en el líquido folicular no sigue de manera inmediata a la oleada de gonadotropinas, como sucede con los esteroides. Cuando se inhibe la síntesis de prostaglandinas, el ovocito permanece en el interior del folículo luteinizado en el ovario, debido a que la $PGF_{2\alpha}$ participa en la ruptura folicular y la prostaglandina E_2 en la remodelación de

las capas foliculares, que terminan en la formación del cuerpo lúteo (Hafez y Hafez, 2003).

El estroma ovárico y las capas concéntricas de la teca externa de folículos preovulatorios contienen células de músculo liso ricamente inervadas por terminaciones nerviosas autónomas, las contracciones que se generan en el ovario facilitan la rotura folicular después de que se ha adelgazado el ápice del folículo y el sistema neuromuscular tecal, estimulado por la $PGF_{2\alpha}$, contribuye a la expulsión del ovocito (Hafez y Hafez, 2003).

Al inicio del estro, ocurre una oleada preovulatoria de gonadotropinas cuando la progesterona ha disminuido a sus concentraciones sanguíneas mínimas y cuando el estradiol alcanza sus mayores valores en el ciclo. El estradiol actúa a dos niveles: en la hipófisis y el hipotálamo. Aumenta la sensibilidad de las células hipofisarias productoras de gonadotropinas a la hormona hipotalámica GnRH (Hafez y Hafez, 2003).

2.1.7 El proceso de Ovulación

Para que se lleve a cabo la ovulación, el folículo de De Graaf y el ovocito que contiene, deben sufrir cambios posteriores que sólo pueden tener lugar bajo condiciones hormonales controladas precisas; el nivel de FSH en circulación

permanece elevado durante un corto periodo al principio de la fase de crecimiento; después de este periodo las cantidades de FSH y LH permanecen constantes hasta un poco antes de la ovulación. Los niveles de estas hormonas se elevan y en consecuencia, es probable que la relación de estas entre sí sea casi tan importante en el control de la maduración preovulatoria como lo es la LH sola (Austin y Short, 1982).

Se dice que la onda de LH o el aumento en los estrógenos que la provoca, induce una ola final de mitosis en las células granulosas, de tal manera que su número alcanza una cantidad óptima para el folículo ovulatorio de De Graaf. La cantidad de líquido folicular que se encuentra en el antro también aumenta considerablemente; debido a un aumento en la permeabilidad de la barrera foliculosanguínea; la presión intrafolicular aumenta inicialmente en respuesta a la LH y sufre una fluctuación antes de la ovulación y el folículo aumenta de tamaño considerablemente. Durante la maduración final del folículo las células adyacentes al ovocito adquieren su forma columnar característica, inicialmente el cúmulo ovárico se adosa a la membrana granulosa en un área extensa, el tamaño de esta zona se reduce gradualmente, en parte por los movimientos y porque las células granulosas se liberan y también la acumulación del líquido en el antro. Posteriormente el área de adosamiento se reduce hasta formar un tallo pequeño. En este momento la capa más interna de células del cúmulo ovárico, que se llama corona radiada, y el ovocito con su cubierta

de células de la corona puede quedar flotando libremente en el líquido folicular un poco antes de la ovulación (Austin y Short, 1982).

Los cambios en la estructura del folículo de De Graaf se acompañan de un reinicio de la meiosis en el ovocito, al principio de la maduración preovulatoria la célula es todavía un ovocito primario en el que el progreso de la meiosis es interrumpido después del diploteno, en el momento en que se presenta la onda de LH se completa la profase de la primera división meiótica. Sigue inmediatamente la metafase I en la cual los cromosomas bivalentes se acomodan y se pegan a los microtúbulos en el ecuador del huso meiótico, durante la anafase los cromosomas bivalentes se movilizan a los extremos opuestos del huso, la separación de los dos grupos de cromosomas es completa en este momento, el área del huso que se encuentra entre ellos se elonga y la división del citoplasma del ovocito transcurre rápidamente formando un surco alrededor del grupo más externo de cromosomas. Esta división del óvulo es desigual ya que una de las células hijas (el ovocito secundario) recibe la mayor parte del citoplasma, mientras que la otra contiene el mínimo de ooplasma y constituye el primer cuerpo polar (Austin y Short, 1982).

Un poco después de la eliminación del primer cuerpo polar, el ovocito secundario pasa a la segunda división meiótica, en la que la profase es muy corta o parece no existir; los cromosomas se condensan para formar una masa en forma de media luna en la periferia del ovocito (fase de la masa de cromatina). Posteriormente

aparecen unas fibras del huso adyacentes a la cromatina y los cromosomas se acomodan en la placa de la metafase. En la mayoría de las especies el ovocito presenta una detención en la MII y es en este momento cuando generalmente se efectúa la ovulación; en los ovocitos de tamaño menor en especies como porcino, ovino y bovino frecuentemente se bloquea su maduración en la metafase I. Por lo tanto, el tamaño folicular es el que controla a la meiosis, de modo que los ovocitos de los folículos preantrales no responderán al tratamiento con LH antes de la fase V ó VI del crecimiento, después de la cual la meiosis avanza solamente hasta la metafase I; sólo los ovocitos de los folículos de De Graaf pueden sostener la meiosis hasta el punto en que comienza la ovulación después de la maduración meiótica el desarrollo subsecuente del ovocito depende de la penetración de un espermatozoide durante la fertilización (Austin y Short, 1982).

La ovulación se produce al salir el ovocito del folículo de De Graaf. Después de la oleada de gonadotropinas, aumenta el flujo sanguíneo hacia los folículos, el destinado a ovular recibe el mayor volumen de sangre en términos absolutos. Cuando el folículo en crecimiento comienza a hacer protrusión en la superficie ovárica, su vascularidad superficial aumenta excepto en su centro, que aparece desprovisto de vasos sanguíneos y que es el futuro punto de ruptura (Hafez y Hafez, 2003). Una pequeña área de la pared del folículo y de la corteza ovárica que lo recubre se vuelve delgada y translúcida, formando el estigma. Hacia el final del periodo en que ocurren estos cambios, el estigma sobresale como una ampolla en la

superficie del ovario, que con el inicio de la ovulación se rompe y el líquido folicular sale lentamente, de este modo, el ovocito, que ahora se encuentra flotando libremente, sale pasivamente junto con restos del folículo (células granulosas descamadas) y se dirige hacia la trompa de Falopio conducido por las corrientes ciliares (Austin y Short, 1982).

Una vez ocurrida la ovulación hay cambios que dan como resultado la formación de una verdadera glándula endocrina dentro del ovario, el cuerpo amarillo. Los remanentes del anro son obliterados rápidamente por la proliferación de células de la granulosa que se transforman en células del cuerpo amarillo (células luteínicas); también hay una infiltración con capilares que provienen de la teca interna. Algunas de las células de esta capa penetran junto con los capilares para formar las paredes de subdivisión, las trabéculas, pero el mayor componente de la glándula se deriva de la granulosa. La función del cuerpo amarillo es secretar la progesterona que sirve para mantener la gestación (Austin y Short, 1982).

El ovocito está separado del exterior del folículo por epitelio superficial, túnica albugínea rica en colágena, teca externa, membrana basal que separa la red capilar de la membrana granulosa y por la misma membrana granulosa. El crecimiento preovulatorio se asocia a cambios en las relaciones entre células de la granulosa y de la teca, tales cambios son también prerrequisito para la mayor organización del cuerpo amarillo. Las células del montículo ancladas a la ZP permanecen rodeando al

ovocito y formando la corona radiada. La disociación de las células del cúmulo libera al ovocito de la capa granulosa y se reanuda la meiosis después de la oleada de gonadotropinas.

La ovulación ocurre en respuesta a varios mecanismos fisiológicos, bioquímicos y biofísicos; las prostaglandinas estimulan las contracciones ováricas y activan a los fibroblastos tecales para aumentar las enzimas proteolíticas que digieren la pared folicular y la lámina basal; también es posible que participen esteroides como la progesterona (Hafez y Hafez, 2003).

Los ovocitos maduros pueden ser colectados del oviducto después de ser ovulados y los inmaduros pueden ser obtenidos de ovarios de rastro, por punción y aspiración de los folículos (Wani et al., 2000). Se ha observado una asociación entre su desarrollo *in vitro* y el número de células de la granulosa que los rodean, el núcleo del ovocito y su diámetro (Lundy et al., 1999), su desarrollo también se ve favorecido por la presencia de líquido folicular en el medio de cultivo (Stock et al., 1997).

2.2 Fertilización *in vitro*

El proceso de fertilización *in vitro* (FIV), se realiza después de la maduración *in vivo* o *in vitro* (MIV) de los ovocitos. De manera general, en la especie porcina este procedimiento se lleva a cabo de la siguiente manera (Abeydeera et al., 1998ab): la

MIV se lleva a cabo a las 44 h de incubación en un medio de maduración. Después de esto, con hialuronidasa al 0.1% y/o de forma mecánica a los ovocitos se les retiran las células del cúmulo. La inseminación se realiza en un medio de fertilización, añadiendo espermatozoides frescos o congelados. La coincubación de los gametos se lleva a cabo por un periodo de 3 h (Somfai et al., 2010); 5 h (Shi et al., 2007); 6 h (Men et al., 2006); o 7 h (Ducolomb et al., 2003). Finalmente, los presuntos cigotos son transferidos a un medio de desarrollo para que se lleve a cabo el desarrollo embrionario (DE) temprano hasta la etapa de blastocisto (Abeydeera et al., 1998ab). En esta especie, tanto los gametos como los cigotos y embriones se incuban a 39 °C con 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación.

En la especie ovina los ovocitos pueden ser madurados *in vivo* o *in vitro* con un tiempo de MIV de 24 h. Para realizar la FIV a los ovocitos generalmente no se les retiran las células del cúmulo. Para la inseminación los espermatozoides pueden ser frescos o congelados y el periodo de coincubación es de 12 h. Trascurrido este tiempo, a los cigotos se les retiran las células del cúmulo y se transfieren a medios de desarrollo embrionario que pueden ser únicos en los que los embriones se incuban hasta su máximo estado de desarrollo, o medios secuenciales en los que los embriones se incuban en un determinado medio durante las primeras 72 h y posteriormente se transfieren a otro hasta que llegan a la etapa de blastocisto (Byrd et al., 1997; Kochhar et al., 2002). Las condiciones de incubación para la MIV, FIV y DE son similares a las requeridas en el porcino.

2.3 Estudios de vitrificación de ovocitos en animales domésticos

La importancia de la vitrificación de ovocitos y embriones es la preservación genética de las hembras (Saragusty y Arav, 2011). La vitrificación de ovocitos deberá ser una contribución significativa para la producción de embriones, aplicación de varias tecnologías reproductivas y el establecimiento de bancos de genes (Shi et al., 2007). La vitrificación se puede realizar en diferentes especies y en sitios geográficos lejanos sin la necesidad de usar equipo sofisticado, lo cual hace que la técnica sea de aplicación práctica (Saragusty y Arav, 2011).

Se tienen diferencias significativas en los ovocitos y embriones con respecto a los espermatozoides en la vitrificación; el tamaño de los ovocitos de los mamíferos son tres a cuatro veces más grandes que el de los espermatozoides, lo que disminuye substancialmente la proporción de la superficie por el volumen, lo que hace a los ovocitos más sensibles al enfriamiento y a la formación de hielo intracelular (Saragusty y Arav, 2011).

Actualmente se utilizan dos métodos en la criopreservación de ovocitos y embriones; la congelación lenta y la vitrificación. La congelación lenta tiene la ventaja de usar bajas concentraciones de crioprotectores, los cuales están asociados con toxicidad química y choque osmótico. Los primeros antecedentes del daño por enfriamiento y

muerte de las células por bajas temperaturas data de 1897, (Arav et al., 2002). La congelación lenta fue aplicada con éxito en espermatozoides en 1949 y los primeros embriones criopreservados fueron de murino en 1971. También se tienen antecedentes de criopreservación de embriones de bovino (1973), ovino (1974), caprino (1976), equino (1982) y porcino (1989), (Saragusty y Arav, 2011).

La vitrificación es un método rápido (del orden de minutos), el cual disminuye el daño por enfriamiento (choque frío). La definición física de la vitrificación es la solidificación de una solución (formación de vidrio) a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo (Vajta, 2000). En la vitrificación se tiene una velocidad de enfriamiento de 11000 a 24000 °C/ min, y esta se puede modificar por tres factores; 1) el procedimiento que puede consistir vitrificar en un solo paso o en dos pasos, equilibrio y vitrificación, 2) concentración de crioprotectores y 3) recipientes (Vajta, 2000). Los primeros antecedentes de vitrificación de espermatozoides de rana data de 1938, (Arav et al., 2002). Es posible que indirectamente en 1963, debido a los procedimientos básicos de la congelación lenta se hayan establecido los principios de la vitrificación. Al realizar el procedimiento de congelación lenta se observó que el seeding (siembra; enfriamiento exterior de la pajilla) daba como resultado la salida de agua del germoplasma mediante un movimiento osmótico activo con la deshidratación gradual por efecto de la disminución de la temperatura en la cual la matriz intracelular se vitrifica, dando lugar así al procedimiento de la vitrificación. Los primeros embriones vitrificados con éxito fueron de rata en 1975,

(Saragusty y Arav, 2011). Por otra parte se han vitrificado ovocitos, de bovino (Hochi et al., 1998; Hurt et al., 2000; Asada et al., 2002; Men et al., 2002), equino (Hurt et al., 2000; Tharasanit et al., 2006a, 2006b, 2009), caprino (Bejín et al., 2003) y murino (Seguino et al., 2003; Hasegawa et al., 2004; Revel et al., 2004; Wang et al., 2009).

En las especies animales donde se ha practicado la criopreservación de ovocitos, se han implementado diversas metodologías que incluyen diferentes crioprotectores, recipientes y tiempos en el proceso de vitrificación. Las diferencias observadas están relacionadas a determinadas características entre las que se encuentran el estado de desarrollo del ovocito, el cual puede ser inmaduro en estado de VG o maduro en estado de MII. Se tiene conocimiento de que los ovocitos en estado de VG pueden sobrevivir al proceso de vitrificación en mayor porcentaje que los maduros, se cree que dicha capacidad es debida a que la cromatina aún no está condensada y puede recuperarse después de la vitrificación (Albarracin et al., 2005)

El proceso de vitrificación se ha realizado en ovocitos porcinos, se ha medido su viabilidad después de la vitrificación (Nagashima et al., 1999; MingChe et al., 1999; Jennfa et al., 2002), y se ha evaluado la maduración después de la vitrificación (WeiTung y Holtz, 2002; Fujihira et al., 2004; Gupta et al., 2007; Huang et al., 2008). Por otra parte se tiene conocimiento de que los embriones porcinos son altamente sensibles a temperaturas inferiores a 15 °C y de que el número de nacimientos con embriones criopreservados es limitado (Kuwayama et al., 1997).

La presencia de células del cúmulo ha demostrado ser importante para el desarrollo y maduración de ovocitos de ovino (Wani, 2002), y la adición de 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) proporciona mejores resultados de maduración posiblemente porque contiene entre otros componentes albúmina, la cual establece un balance osmótico (Picton et al., 2003). Se ha logrado obtener maduración de ovocitos de ovino después de su desvitrificación (Al-aghbari y Menino, 2002) y se ha observado que el suero humano es mejor que el de oveja para el desarrollo del embrión (Wani, 2002). El polivinil alcohol (PVA) puede ser utilizado para substituir al SFB en una proporción de 0.1% por 20%, en la criopreservación de embriones de ovejas con buenos resultados (Naitana et al., 1997), y también se han obtenido resultados favorables en la vitrificación de embriones de ovino (Dattena et al., 2000; Rizos et al., 2002) y bovino (Kuwayama et al., 1997; Hochi, 2003).

La respuesta de supervivencia al proceso de vitrificación de ovocitos inmaduros, ovocitos maduros y embriones es variable, debido a factores como el tipo de recipiente utilizado para realizar la vitrificación, los resultados más favorables los han presentado las mórulas y los blastocistos (Cocero et al., 1996).

2.4 Crioprotectores

2.4.1 Tipos de crioprotectores

Para aumentar la supervivencia de los ovocitos y embriones después de la desvitrificación se han utilizado diversos crioprotectores y se han analizado diversas variables, los crioprotectores se clasifican en dos categorías:

1) Intracelulares (< de 90 Daltons). Son crioprotectores de bajo peso molecular y por consiguiente pueden penetrar al interior de la célula, entre ellos están: glicerol (G), etilén glicol (EG), propilén glicol (PG) y dimetilsulfóxido (DMSO), (Gordon, 1994).

Los crioprotectores intracelulares o permeables, forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua e impiden la cristalización de hielo. En altas concentraciones inhiben la formación de cristales de hielo y generan la formación de cristal sólido que no se expande, este proceso es conocido como “vitrificación”. Otro efecto de los crioprotectores permeables es que protegen a la célula de los efectos de la solución y mantienen en dilución a los electrolitos, este proceso se conoce como la “regla de fase”, en la que la concentración de soluto en la fase líquida es constante para una temperatura dada (Marina et al., 2002).

2) Extracelulares (> de 240 Daltons). Estos crioprotectores son moléculas grandes y no pueden penetrar al interior de la célula, entre ellos se tienen: sacarosa, trehalosa, polivinil pirrolidona (PVP), suero fetal bovino (SFB), yema de huevo (YH) y albúmina sérica bovina (BSA), (Gordon, 1994).

Los crioprotectores extracelulares o no permeables se mantienen fuera de la célula, aumentando la concentración extracelular de solutos y por tanto aumentando la presión osmótica extracelular en relación con la intracelular. Este desnivel osmótico induce la salida de agua intracelular al exterior, la alta concentración de solutos extracelulares se diluye hasta que el agua extracelular se congela. La célula se deshidrata, disminuye su volumen y el riesgo de formación de cristales de hielo intracelulares se reduce (Marina et al., 2002). Entre estos crioprotectores se encuentran la sacarosa y la trehalosa, que protegen a la célula por deshidratación, además juegan un papel importante en el proceso de desvitrificación, ya que impiden el excesivo movimiento del agua, la hinchazón y la ruptura de la célula (Corti, 2006).

2.4.2 Mecanismos de acción de los crioprotectores

Los crioprotectores Intracelulares como: El EG tiene un peso molecular de 62.07 Daltons (Da). Es un crioprotector de penetración rápida, reduce el cambio de volumen y el tiempo de exposición para completar el equilibrio osmótico de los

ovocitos. En alta concentración (más de 35%) o prolongada exposición (más de 1 minuto) produce daño excesivo de la membrana y reduce potencialmente el desarrollo embrionario posterior (Hotamisligil et al., 1996).

El DMSO es un agente crioprotector con un peso molecular de 78.13 Da, tiene la característica de aceptar protones, impide el daño causado por cristales de hielo en la congelación, por concentración de electrolitos, deshidratación, cambios de pH y desnaturalización de proteínas (Sigma, 2006-2007).

Los crioprotectores extracelulares como: La PVP tiene un peso molecular de 40,000 Da, es un coloide que tiene la propiedad de retener gran cantidad de agua, aumenta la viscosidad en el medio de vitrificación y es particularmente importante utilizarlo cuando hay bajas concentraciones de suero, ya que en medios de cultivo con ausencia de suero no propicia el crecimiento celular (Freshney, 1987).

El SFB tiene componentes que intervienen en el desarrollo celular como son las proteínas, a las cuales se unen minerales, ácidos grasos y hormonas. Las proteínas que han mostrado beneficios son la albúmina, globulinas, fibronectina, fetuina y transferrina (Freshney, 1987), que pueden tener diferentes funciones (Melo y Cuamatzi, 2004), también se tiene conocimiento de que los aminoácidos son fácilmente conducidos por proteínas que actúan como transportadores específicos dentro de la membrana plasmática de la célula (Foxcroft et al., 1993).

La yema de huevo contiene el fosfolípido fosfatidilcolina, que tiene una temperatura de transición de $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando está totalmente hidratada, característica que impide la formación de cristales de hielo durante el proceso de criopreservación de células (Corti, 2006).

La trehalosa tiene un peso molecular de 378.33 Da, es un disacárido natural formado por la unión de dos moléculas de glucosa, tiene características más favorables que otros azúcares para la estabilización de las proteínas y de la doble capa de fosfolípidos de las membranas biológicas (Corti, 2006). Tiene una acción protectora relacionada con el efecto osmótico y participa en interacciones específicas con los fosfolípidos de la membrana (Abe et al., 2005), estabiliza la bicapa de lípidos de la membrana y ejerce una función protectora contra el frío (Conejo, 2003).

La sacarosa tiene un peso molecular de 342.3 Da, se une a la superficie del material que se va a deshidratar, aumenta la viscosidad y lleva la temperatura de transición a temperaturas inferiores a las que se conserva el sistema con la formación de hielo. Durante la deshidratación el azúcar reemplaza al agua que hidrata las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que reduce la temperatura de transición y permite la vitrificación (Corti, 2006). La concentración de glucosa es más alta en el líquido

extracelular que en la célula, en tanto que sucede lo contrario con las proteínas (Murray et al., 2004).

2.5 Método de vitrificación

Para la criopreservación de gametos, se requiere mantener un balance entre varios factores, como son: formación de cristales, daño osmótico, toxicidad de los crioprotectores, concentración intracelular de electrolitos, daño por enfriamiento, fractura de la ZP, alteraciones de los organelos y cambios en el citoesqueleto (Vajta, 2000). Cuando el agua es enfriada por debajo del punto de congelación, se solidifica y forma hielo, el cual es menos denso que el agua en forma líquida y por consiguiente ocupa un mayor volumen, este cambio causa presión y separa uniones membranales en los organelos intracelulares los cuales pueden sufrir considerable daño. Por otra parte, durante el calentamiento el hielo se derrite y libera agua, produciendo una disminución de la osmolaridad de la solución circundante, ocasionando un choque osmótico. El uso de crioprotectores puede evitar este daño, pero la concentración de electrolitos y otros solutos pueden reaccionar y ser tóxicos para las proteínas intracelulares. No obstante, el mantenimiento de la viabilidad por largo tiempo después de un periodo de crioconservación se ha logrado en las células de mamíferos, ya que pueden vivir si se encuentran dentro de un estado de animación suspendida a una temperatura de -196°C (Jain y Paulson, 2006), ya que a esta temperatura cesa toda actividad biológica de las células (Hafez y Hafez,

2003). La vitrificación es la solidificación de material biológico sin la formación de cristales de hielo y el procedimiento es más rápido que la congelación (Vajta, 2000). Los crioprotectores 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 crioprotectores al cruzar la membrana pueden inducir alteraciones en su estructura (Leoni et al., 2008). La vitrificación de ovocitos inmaduros y maduros se ha realizado en diferentes especies, con resultados variables (Fujihira et al., 2004; Diez et al., 2005; Somfai et al., 2010). Sin embargo, aún no es reconocida como un procedimiento bien establecido, debido a la reducción del potencial para el desarrollo y la falta de información sobre las características biológicas esenciales de los ovocitos después de la desvitrificación (Ledda et al., 2007; Succu et al., 2011).

2.6 Sensibilidad de las células a la vitrificación

Los estadios de maduración meiótica de los ovocitos pueden influir en su capacidad para sobrevivir a la criopreservación, los índices de supervivencia en estado de VG son todavía muy bajos en el bovino y porcino. Se ha tenido un porcentaje similar de división embrionaria tras el proceso de vitrificación de ovocitos bovinos criopreservados en estado de MII e inmaduros con rompimiento de VG, 12.6% y 9.9% respectivamente (Albarracin et al., 2005). La vitrificación de ovocitos vitrificados

en MII muestran una mayor capacidad para recuperarse del daño causado por la criopreservación en comparación con los del estadio de GV, en humanos (Boiso et al., 2002), porcinos (Rojas et al., 2004) y equinos (Hurt et al., 2000), lo cual probablemente es debido a diferencias en la conductividad hidráulica (Agca et al., 2000). El número de capas de células de la granulosa que rodean a los ovocitos antes de la vitrificación también es importante para su posterior supervivencia y desarrollo (Fujihira et al., 2005).

Un aspecto importante de la criopreservación de los ovocitos es que la supervivencia y la competencia de desarrollo están altamente afectadas como una consecuencia del daño morfológico y fisiológico inducido por el proceso de criopreservación, el cual causa alteraciones del citoesqueleto, mitocondrias, gránulos corticales y membrana plasmática (Shi et al., 2007).

Uno de los componentes celulares que se pueden dañar durante la criopreservación es el citoesqueleto (Saragusty y Arav, 2011). El daño del citoesqueleto puede ser intrínseco a los cambios en la forma y deshidratación que acompañan al procedimiento de la criopreservación, el cual puede conducir a la liberación prematura de los gránulos corticales y endurecimiento de la ZP. La desvitrificación puede producir el rompimiento de la membrana y liberación de enzimas que pueden bloquear la fertilización o causar poliespermia. El movimiento de las mitocondrias dentro de las diferentes áreas de la célula es mediado por el citoesqueleto y la red

de microtúbulos, por consiguiente dicho movimiento regula la supervivencia de la célula debido a la función primaria de las mitocondrias que generan ATP necesario para varias funciones, incluyendo la homeostasis celular. La organización mitocondrial y su actividad son necesarias para la maduración citoplásmica e inicio de la meiosis, lo cual puede afectar el subsecuente desarrollo (Shi et al., 2007). La valoración de la integridad del citoesqueleto está asociada al desarrollo de los ovocitos después de la desvitrificación.

2.7 Tipos de recipientes utilizados en la vitrificación

Son diversos los tipos de recipientes en los cuales se ha realizado el proceso de vitrificación; los más comúnmente usados son: pajillas de 0.5 ml (Gordon, 1994), pajillas de 0.25 ml (Kuwayama et al., 2005), pajilla abierta estirada (open pulled straw OPS) de 1-1.5 μ l (Rojas et al., 2004), pajilla abierta super estirada (super open pulled straw SOPS) de 0.5-1.0 μ l (Isachenko, 2005), Cryoloop 0.5 μ l (Lane et al., 1999; Kawakami et al., 2008) y Cryotop <0.1 μ l (Kuwayama et al., 2005; Nagashima et al., 2007; Liu et al., 2008) Para vitrificar a los ovocitos se requiere aumentar la concentración de crioprotectores y esto aumenta su toxicidad, por lo que con los recipientes 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). Aunque los recipientes pueden presentar ciertas ventajas entre ellos, la especie animal de la cual provengan los ovocitos puede ser determinante en los resultados favorables, en este sentido el bovino ha tenido mejores resultados en la vitrificación de ovocitos inmaduros en estado de VG en comparación con los recipientes cryoloop (Mavrides y Morroll, 2002) y OPS (Morato et al., 2008).

2.8 Tiempo en que se realiza la vitrificación

En relación al tiempo requerido para realizar el proceso de vitrificación, básicamente se tienen dos conceptos, la vitrificación en dos pasos y de un sólo paso: El de un sólo paso, implica que se utiliza una concentración alta de crioprotector en un corto periodo de tiempo, generalmente 1 minuto (Kuwayama et al., 2005). En el de dos pasos, la muestra es colocada en un medio que contiene una baja concentración de crioprotector, éste es considerado también como el período de equilibrio y tiene una duración aproximada de 15 min, después de transcurrido este tiempo el segundo paso es colocar la muestra en el medio de vitrificación que tiene una mayor concentración de crioprotector y el tiempo requerido para vitrificarla es menor a 1 minuto (Al-aghbari y Menino, 2002).

2.9 La vitrificación de ovocitos porcinos

La característica reproductiva de la cerda de tener más de una cría por camada, ha ocasionado poco interés en el desarrollo de procedimientos que permitan obtener un mejoramiento genético a través de la reproducción asistida (transferencia de embriones). Sin embargo por las similitudes fisiológicas con los humanos, los cerdos se están utilizando como modelos en investigación biomédica y para crear animales genéticamente modificados como potenciales donadores de tejidos y órganos para xenotransplantes (Hunter, 2000).

Particularmente los porcinos son un modelo apropiado para el reconocimiento e interacción de los gametos durante la fertilización y estudios de desarrollo embrionario temprano (Ducolomb et al., 2003). Para obtener embriones *in vitro* se requiere de la maduración de los ovocitos, ésta puede ser influenciada por varios factores que son derivados del folículo, así como de los componentes propios del líquido folicular (Wani, 2002). La maduración con 10% de suero fetal bovino la favorece, debido a sus componentes entre los que se encuentran: aminoácidos, carbohidratos, hormonas, factores de crecimiento, algunos componentes indefinidos y proteínas como la albúmina que ayuda a establecer un balance osmótico en el medio (Picton et al., 2003).

La habilidad del ovocito para formar pronúcleos masculinos después de la penetración del espermatozoide depende en gran parte de la presencia de las células del cúmulo durante la maduración debido a la importancia que tienen en la regulación de los factores citoplásmicos responsables de remover las envolturas nucleares del espermatozoide; también contribuyen la presencia de glutatión y de los aminoácidos cisteína y glutamina (Mori et al., 2000), la cisteína también afecta significativamente la maduración citoplásmica de los ovocitos porcinos (Wang et al., 1997), probablemente porque los ovocitos porcinos usan triglicéridos endógenos como fuente de energía en la maduración *in vitro* (Wheeler et al. 2004).

Aunque la vitrificación ofrece una alternativa para la criopreservación de gametos, se ha observado que los ovocitos son más difíciles de criopreservar que el cigoto o embriones de mayor estadio de desarrollo, sin embargo esta técnica puede permitir el establecimiento de bancos de ovocitos criopreservados (Hochi, 1998, 2003). Una característica desfavorable para los embriones porcinos es que son difíciles de criopreservar por congelación o vitrificación, debido a la gran cantidad de gotas de lípidos que contienen, las cuales son características de esta especie (Somfai et al., 2009).

Para mejorar la viabilidad, la maduración y el desarrollo embrionario, se han realizado diferentes protocolos de vitrificación usando diversos crioprotectores en ovocitos porcinos con resultados variables (Nagashima et al., 2007; Somfai et al.,

2010; Gil et al., 2010). Además, procedimientos muy específicos, como la delipidación de ovocitos antes de la vitrificación han llevado a un aumento en la tolerancia a la criopreservación y el desarrollo embrionario (Isachenko et al., 2003; Pereira y Marques, 2008), asimismo se ha utilizado la Citocalasina B para mejorar las condiciones del proceso de vitrificación, ésta hace la membrana menos rígida y más elástica, estabilizándola para detener el daño durante la criopreservación (Nagashima et al., 1999; Dobrinsky et al., 2000; Fujihira et al., 2004; Silvestre et al., 2006); aún con la aplicación de los procedimientos citados se considera que la vitrificación a menudo provoca serios daños en las estructuras de las mitocondrias, membranas, gránulos corticales y componentes básicos del citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos), (Zhou y Li, 2009).

2.10 La vitrificación de ovocitos de ovino

En las hembras de algunas especies de mamíferos el periodo de gestación y el comportamiento reproductivo estacional ocasiona una disminución en el número de crías durante su vida productiva. En el ovino se pueden obtener un gran número de ovocitos fuera de la época reproductiva para realizar estudios de biotecnologías como transgénesis y clonación, o bien embriones para mejoramiento genético. La FIV puede proveer de embriones de animales valiosos a menor costo que los obtenidos por inseminación artificial y monta natural, pero sólo se han tenido limitados avances en la congelación de embriones de ovino y especialmente en la

producción de embriones *in vitro*, sin embargo la técnica de criopreservación puede ser un método accesible y eficiente para su producción (Zhu et al., 2001).

Diversos crioprotectores como propilén glicol, glicerol, Ficoll 70 y sacarosa se han utilizado en la vitrificación de ovocitos de ovino con resultados favorables en el porcentaje de gestación (Martínez y Matkovic, 1998); mediante el proceso de congelación la supervivencia de embriones fue eficiente al usar EG, propilén glicol, dimetil sulfóxido y glicerol (Songsasen et al., 1995), mientras que otro estudio indica que con el EG se presenta mayor viabilidad en embriones ovinos que cuando se usa glicerol en las etapas de desarrollo embrionario de mórula y blastocisto (Cocero et al., 1996).

2.11 Tratamientos después de la vitrificación

2.11.1 Desvitrificación

Para la desvitrificación de los COCs vitrificados en los recipientes de un volumen mínimo deben ser calentados por 8 seg a temperatura ambiente (20 °C) y después se sumergen en el medio de descongelación que consiste en TCM-199 con diferentes concentraciones decrecientes de sacarosa o trehalosa a 39 °C, por tiempos que van de 1 a 3 min, este procedimiento también es utilizado para el calentamiento de embriones (Cuello et al., 2004).

2.11.2 Maduración

Los ovocitos desvitrificados de porcino deben ser madurados por 44 h en medio TCM-199 suplementado de acuerdo a lo propuesto por Betancourt et al., (1993); Wang y Niwa, (1995); Ducolomb et al., (2003). Para el cultivo de los ovocitos de ovino después de la desvitrificación se requieren las mismas características del medio de cultivo y sólo cambia el tiempo de incubación que es de 24 horas (Al-aghbari y Menino, 2002).

2.11.3 Fertilización

Una vez madurados se procede a hacer la FIV usando volúmenes de medio diferente, para fertilizar ovocitos porcinos se utilizan gotas de 50 μ l de medio (Abeydeera et al. 1998a y Abeydeera et al. 1998b), en tanto que en ovocitos de ovino se utilizan gotas de 500 μ l (Al-aghbari y Menino, 2002), los tiempos de coincubación también son diferentes: 7 horas en porcinos y 24 horas en ovinos, posteriormente los cigotos son transferidos a medios de cultivo específicos para cada una de las dos especies en estudio.

III.- JUSTIFICACIÓN

Aunque existen estudios relacionados con la criopreservación de ovocitos de cerdas, los resultados de viabilidad y del mantenimiento de las funciones de los ovocitos demuestran que la recuperación es baja, por lo que es necesario continuar buscando estrategias para aumentar la eficiencia de recuperación de ovocitos viables después de la desvitrificación para que tengan la capacidad de madurar y producir embriones después de la fertilización.

La criopreservación de ovocitos de porcino y ovino en diferentes estados de maduración puede servir como modelo para la preservación de estos gametos en otras especies animales. Por consiguiente la vitrificación de ovocitos de animales con alto valor genético es importante y tiene aplicación en aquellos que por alguna causa presenten una incapacidad física para reproducirse o bien cuando han llegado al límite de su vida productiva pero aún conservan sus funciones reproductivas.

En el ganado la aplicación de esta técnica es importante debido a que una vaca puede llegar a alcanzar una longevidad de 15 años, durante este período de manera natural solamente puede producir 12 crías y la criopreservación puede ampliar la descendencia de estos animales.

Esta técnica también puede servir como modelo para la aplicación en la conservación de ovocitos humanos por la similitud fisiológica existente con el porcino y así aplicarse en la reproducción asistida.

En los últimos años, en humanos ha tenido un surgimiento significativo del potencial benéfico de la congelación de ovocitos (Tucker et al., 2004a) y tejido ovárico (Dudzinski, 2004). La vitrificación de ovocitos ofrece una alternativa para resolver la infertilidad femenina como un recurso estupendo para disponer de gametos femeninos susceptibles de fertilización *in vitro*, reduciendo los costos y mejorando su aplicación (Tucker et al., 2004b).

Actualmente se tienen diferentes tipos de recipientes en los que se puede realizar la vitrificación con volúmenes muy bajos de medio de vitrificación, sin embargo se ha observado que aunque los resultados de la vitrificación de ovocitos son variables, se obtienen resultados más favorables cuando se vitrifican mórulas y blastocistos (Cocero et al., 1996).

IV.- HIPÓTESIS

4.1 HIPÓTESIS GENERAL

Diversos estudios se han realizado en el proceso de criopreservación del material genético, en los cuales se han incluido la vitrificación de embriones, tejido ovárico y ovocitos maduros e inmaduros en diversas especies de animales. En el ovario, los ovocitos inmaduros se encuentran en mayor cantidad lo cual puede representar una ventaja para su utilización con respecto a los ovocitos maduros de los que se dispone en menor cantidad; dadas estas condiciones, se considera que el proceso de vitrificación de ovocitos inmaduros (COCs) de porcino y ovino, aumentará las posibilidades de éxito en la obtención de ovocitos viables después de la desvitrificación, los cuales pueden ser madurados y fertilizados *in vitro*, a fin de alcanzar el desarrollo embrionario de los mismos.

4.2 HIPÓTESIS PARTICULARES

- La viabilidad observada en los ovocitos inmaduros de porcino y ovino con el proceso de vitrificación ha generado información que parece indicar que los ovocitos de porcino resisten menos al proceso de vitrificación debido al alto contenido de lípidos en su citoplasma (Gajda, 2009). Por consiguiente, se considera que los ovocitos de ovino tendrán un mayor porcentaje de viabilidad, maduración y

desarrollo embrionario después de la vitrificación con respecto a los ovocitos porcinos sometidos a las mismas condiciones de criopreservación.

- El proceso de vitrificación presenta ventajas sobre el método de congelación lenta, en el sentido de que una alta concentración de crioprotectores puede permitir usar un menor volumen de la solución de vitrificación, por consiguiente si la vitrificación se realiza en un volumen menor, los ovocitos de porcino y ovino presentarán mayor viabilidad, maduración y desarrollo embrionario después de la vitrificación.

V.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la viabilidad, maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos inmaduros (COCs) de porcino y ovino, vitrificados en tres diferentes tipos de recipientes, con mínimo volumen de criopreservadores.

VI.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de la técnica de vitrificación de ovocitos inmaduros (COCs) de porcino en diferentes recipientes en la viabilidad, maduración, fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario.
- Evaluar el efecto de la técnica de vitrificación de ovocitos inmaduros de ovino en diferentes recipientes en la viabilidad, maduración, fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario.

VII.- DISEÑO EXPERIMENTAL

La toma de muestras y el procedimiento general para evaluar la viabilidad, maduración e integridad del citoesqueleto se llevó a cabo bajo el siguiente diseño experimental.



El proceso inicia con la colecta de ovarios en el rastro, a partir de cerdas o borregas púberes recién sacrificadas, una vez que llegan los ovarios al laboratorio son puncionados para obtener los COCs bajo el procedimiento descrito en la metodología en el presente trabajo. En una muestra de ellos fue evaluada la viabilidad y el resto fueron divididos en dos partes, una para maduración y posterior desarrollo embrionario *in vitro* (control frescos), evaluando la viabilidad al finalizar cada uno de estos procesos y la otra parte de los COCs fueron vitrificados y conservados por una semana en nitrógeno líquido. Transcurrido este tiempo se procedió a su desvitrificación y de acuerdo a los procedimientos especificados para

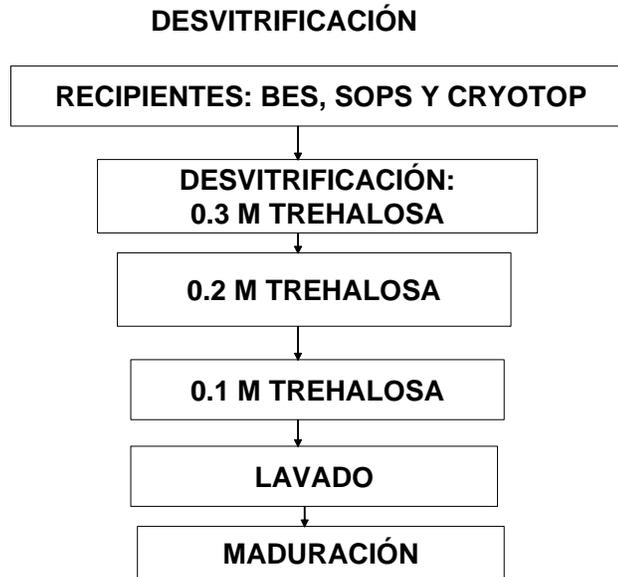
cada especie en estudio, fueron madurados para su posterior fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*. A partir de una muestra de los ovocitos desvitrificados antes y después de la maduración se evaluó la viabilidad y la integridad del citoesqueleto (microfilamentos de actina).

El diseño experimental de la vitrificación desarrollado en dos pasos fue el siguiente:



Una vez obtenidos los COCs se procedió a su vitrificación bajo el procedimiento descrito en la metodología (Al-aghbari y Menino, 2002). El proceso inició con el lavado de los COCs en medio TCM-199 suplementado con SFB y después se colocaron en medio de equilibrio el cual contenía etilén glicol como crioprotector a 37 °C por 15 min, posteriormente fueron transferidos a solución de vitrificación etilén glicol por 20 seg e inmediatamente se colocaron en uno de los 3 recipientes, luego fueron introducidos directamente en nitrógeno líquido y conservados durante una semana para su posterior desvitrificación.

El diseño experimental para la realización de la desvitrificación fue el siguiente:



El proceso de desvitrificación, fue similar para los tres tipos de recipientes pajilla abierta super estirada (SOPS), pajilla de 0.25 mL modificada en el laboratorio con borde biselado (BES) y Cryotop, los COCs de ambas especies se calentaron por inmersión en una solución de TCM-199 adicionada con SFB y que además contenía diferentes concentraciones decrecientes de trehalosa por un tiempo de 3 min en cada una de las soluciones, finalmente fueron lavados en TCM-199 que contenía SFB y colocados en medio de maduración por los tiempos especificados en la metodología para cada especie en estudio.

VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS

El procedimiento general para la maduración de los ovocitos fue el mismo, pero en cada especie se describen las variaciones particulares. A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Los COCs y los embriones se incubaron a 38.5° C con 5% de CO₂ en el aire y la humedad a saturación.

8.1 Colección de Ovocitos

Los ovarios se obtuvieron de cerdas y borregas púberes, en un rastro local, fueron transportados al laboratorio en solución salina que contenía 0.157 M de NaCl, 75 mg/mL de penicilina G potásica y 50 mg/mL de sulfato de estreptomicina a 25-28 °C. Para obtener los complejos ovocitos células del cúmulo (COCs) los folículos de 3 a 6 mm se aspiraron con una aguja hipodérmica de calibre 18 y una jeringa desechable de 10 mL. El líquido folicular fue recogido en un tubo cónico de 50 mL y se dejó reposar por 20 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió dos veces con medio de Tyrode modificado suplementado con 10 mM de lactato de sodio, 10 mM HEPES y 0.1% de alcohol polivinílico (TL-HEPES-PVA) a un pH de 7.3 a 7.4 (Wang y Niwa 1995). Para la recolección de los COCs en la especie ovina, el TL-HEPES-PVA se suplementó además con heparina 200 UI/mL (PISA, México) (Al-aghbari y Menino, 2002). Posteriormente fueron seleccionados los COCs que

presentaron ovocitos con citoplasma uniforme rodeados de una masa de células cúmulo compacta y fueron lavados tres veces en gotas de 500 μ L de medio de maduración, TCM 199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio (In Vitro, México), suplementado con 0.1% de PVA, 3.05 mM D-glucosa, 0.91 mM piruvato sódico, 0.57 mM de cisteína y 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico.

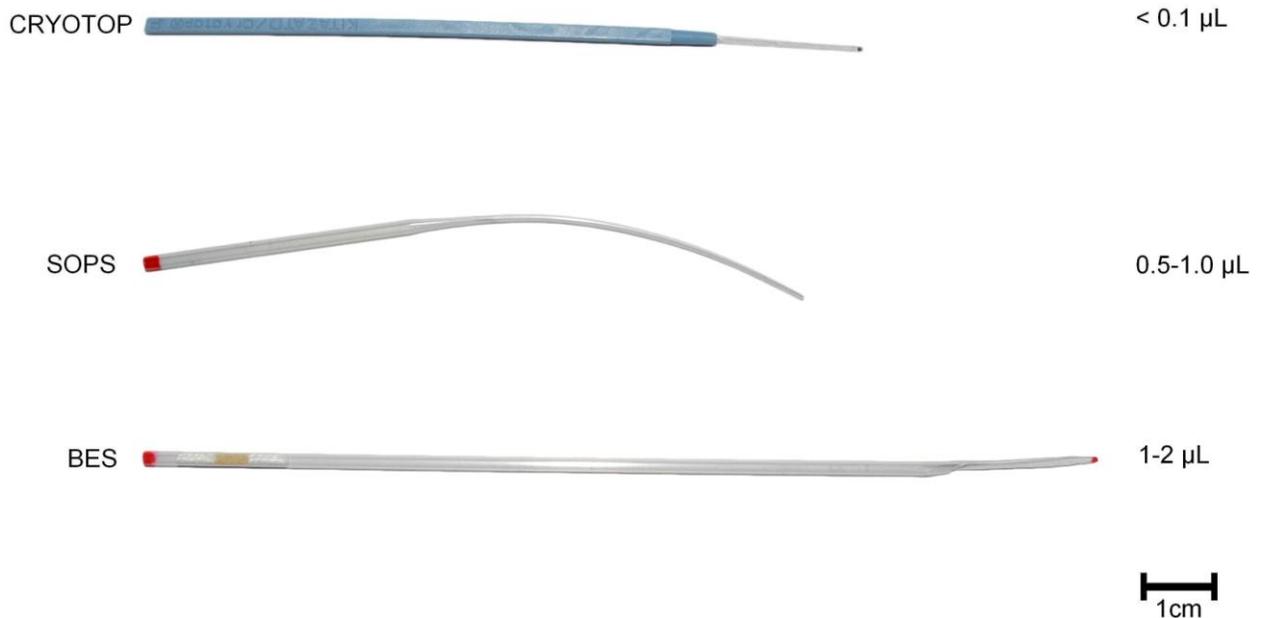
8.2 Vitrificación

El proceso de vitrificación de los COCs en las dos especies inició con un lavado en TCM-199 con sales de Earle, bicarbonato de sodio y HEPES (In Vitro, México), suplementado con 20% de SFB a 37 °C; después se colocaron en el medio de equilibrio, que es el mismo medio de lavado adicionado con EG al 4%. Fueron equilibrados durante 15 min, una vez transcurrido este tiempo se cambiaron a medio de vitrificación que contenía 35% de EG y 0.4 M de trehalosa en donde permanecieron durante 20 seg e inmediatamente fueron colocados en el respectivo recipiente, este último proceso se realizó en menos de un min, posteriormente los recipientes fueron sumergidos en nitrógeno líquido y permanecieron en él durante una semana.

Los recipientes utilizados en el presente estudio fueron: el Cryotop (Kitasato Shizuoka Japón), que permite utilizar un volumen de medio de vitrificación menor a 0.1 μ L, éste se considera que es el más eficiente por que la velocidad de

enfriamiento es mayor: la pajilla SOPS (Minitube, México), con un volumen de 0.5 a 1.0 μL también tiene una velocidad de enfriamiento rápido por lo que puede brindar otra opción en el proceso de vitrificación: la pajilla de 0.25 mL (Procows, México), modificada con borde biselado (BES) que permite vitrificar con un volumen final de 1 a 2 μL , este recipiente fue propuesto como una alternativa para reducir los costos del proceso de vitrificación ya que representa un costo diez veces menor que la pajilla SOPS y cien veces menor que el Cryotop.

A continuación se presenta la fotografía de los recipientes utilizados:



8.3 Desvitrificación de Ovocitos

Una vez transcurrida una semana de almacenamiento en nitrógeno líquido los diferentes tipos de recipientes con los COCs fueron colocados para su desvitrificación por inmersión en una solución de TCM-199 que contenía SFB al 10% y 0.3 M de trehalosa durante 3 min (Al-aghbari y Menino 2002), durante este tiempo los COCs fueron obtenidos por gravedad en el fondo del pozo que contenía al medio de calentamiento, posteriormente se lavaron con el mismo medio pero en pozos diferentes que contenían concentraciones de trehalosa 0.2 M y 0.1 M, sucesivamente, durante 3 min cada uno, después se procedió a lavar los ovocitos con el medio TCM-199 con SFB al 10% sin trehalosa, finalmente fueron transferidos a medio de cultivo para su maduración (Shi et al., 2007), usando el procedimiento de maduración específico para cada especie en estudio, el cual está descrito en el apartado de maduración de ovocitos.

8.4 Maduración de Ovocitos

Los ovocitos frescos o desvitrificados fueron lavados tres veces en gotas de 500 μ L de medio de maduración TCM-199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio (In Vitro, México) suplementado con 0.1% de PVA, 3.05 mM de D-glucosa, 0.91 mM de piruvato sódico, 0.57 mM de cisteína y 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico. La MIV se realizó según lo descrito por Abeydeera et al., (1998a,

1998b), el procedimiento consistió en colocar a los ovocitos en cada pozo de una placa de cuatro pozos (Nunc, Dinamarca), en 500 μ L de medio de maduración suplementado con 0.5 mg/mL de LH y FSH 0.5 mg/mL, los pozos fueron cubiertos con aceite mineral (Fisher Scientific, EE.UU.), los ovocitos de porcino fueron incubados durante 44 h (Wang y Niwa 1995) y los ovocitos de ovino fueron incubados durante 24 h (Byrd et al., 1997; Al-aghbari y Menino 2002). Después de la maduración, algunos ovocitos fueron fijados y teñidos para evaluar la maduración y otros fueron destinados para la fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*.

8.5 Fertilización *In Vitro*

Después de la MIV, la FIV para ovocitos de porcino se realizó según lo descrito por Abeydeera et al., (1998ab) y para los ovocitos de ovino de acuerdo a lo descrito por Byrd et al., (1997) y Al-aghbari y Menino (2002). Los ovocitos de porcino fueron desnudados, las células del cúmulo fueron eliminadas con hialuronidasa 0.1% en medio de maduración, mientras que los de ovino no se desnudaron. Los ovocitos de ambas especies se lavaron dos veces en gotas de 500 μ L de medio de maduración y se lavaron tres veces en gotas 500 μ L de medio amortiguador Tris modificado (mTBM) que consta de 13.1 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 7.5 mM de CaCl₂ • 2H₂O, 20 mM de Tris, 11 mM de glucosa y 5 mM de piruvato de sodio, suplementado con 0.4% de BSA fracción V y 2.5 mM de cafeína. Posteriormente se colocaron 30 ovocitos de porcino en cada pozo con 50 μ L de mTBM. En lo que respecta al ovino,

se depositaron 10 ovocitos en cada pozo con 450 μ L de mTBM. En ambos casos fueron cubiertos con aceite mineral y se incubaron durante 30 min hasta que se hizo la inseminación. Para ambas especies se utilizó semen descongelado con una motilidad progresiva mínima de 50%. Una pajilla de 0.25 mL de semen fue descongelada a 37 °C durante 30 seg, diluido con 3 mL de PBS de Dulbecco (DPBS, Gibco, EE.UU.) suplementado con 0.1% de BSA fracción V, 75 mg/mL penicilina G potásica, y 50 mg/mL sulfato de estreptomicina a un pH de 7.2, posteriormente se centrifugó a 1900 x g por 5 min y el sedimento se diluyó en 100 μ L de mTBM.

Para la FIV de los ovocitos de porcino, se agregaron 50 μ L de la suspensión de espermatozoides a 50 μ L del medio que contenía a los ovocitos, para dar una concentración final de 5×10^5 espermatozoides/mL. Los gametos fueron coincubados durante 7 h (Abeydeera et al., 1998a; 1998b). Después de este período, para eliminar los espermatozoides, los ovocitos porcinos fueron lavados tres veces en gotas de 50 μ L de medio de desarrollo North Carolina State University-23 (NCSU-23) suplementado con 0.4% de BSA libre de ácidos grasos (Petters y Wells, 1993).

Para la FIV de los ovocitos de ovino, se agregaron 50 μ L de la suspensión de espermatozoides a los 450 μ L del medio que contenía a los ovocitos, para dar una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL. Los gametos fueron coincubados durante 21 h, posteriormente se procedió a eliminar mecánicamente las

células del cúmulo y los espermatozoides; los ovocitos fueron lavados tres veces en gotas de 50 μ L de medio fluido oviductual sintético (SOF) 1, suplementado con 10% SFB (Byrd et al., 1997; Kochhar et al., 2002).

8.6 Cultivo de Embriones

Transcurrido el tiempo de coincubación, los ovocitos de porcino fueron lavados y transferidos a gotas de 500 μ L de medio de desarrollo embrionario NCSU-23, se colocaron 30 ovocitos por pozo (Abeydeera et al., 1998ab). Los ovocitos de ovino fueron lavados en medio SOF 1, colocando 10 por pozo, los cuales fueron incubados durante 72 horas y luego fueron transferidos al medio SOF 2, para ser incubados por 96 h (Kochhar et al., 2002). Los ovocitos fertilizados de ambas especies fueron incubados por un total de 168 h; transcurrido este tiempo se evaluó el desarrollo embrionario y la viabilidad e integridad del citoesqueleto, para lo cual se realizó el procedimiento descrito en el apartado correspondiente.

8.7 Evaluación de la Viabilidad de Ovocitos

La viabilidad de los ovocitos fue evaluada en diferentes momentos: al ser obtenidos después de puncionar a los folículos (frescos), después de la MIV (control), al momento de ser desvitrificados o tiempo cero de incubación después de la vitrificación y 44 horas de cultivo después de la maduración. Una vez que se realizó

el manejo de los ovocitos, fueron lavados en medio TL-HEPES-PVA modificado y fueron colocados en 200 μ L de 0.5 mg/mL de MTT (azul de tiazolil) diluido en TBM; después de 2 h, los ovocitos se observaron con un microscopio óptico (Zeiss Axiostar) a 400X. Los ovocitos que mostraron color púrpura en su citoplasma fueron considerados vivos, mientras que los incoloros fueron considerados no viables. Los embriones que mostraron un color púrpura en más de la mitad de sus blastómeros se consideraron viables (Mossman, 1983).

8.8 Evaluación de la Maduración y Fertilización

Para evaluar la maduración y fertilización, los ovocitos fueron tratados con 10 mg/mL bisbenzimidida (Hoechst 33342) por 40 min, luego se lavaron y se incubaron durante 20 min en citrato de sodio al 0.075%. Finalmente, fueron fijados toda la noche con paraformaldehído al 2% y se montaron en PBS-glicerina (1:9). La maduración se evaluó mediante un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axiostar) a 400X. Aquellos ovocitos que mostraron VG fueron considerados inmaduros, los que se observaron en la primera metafase (MI) se consideraron en proceso de maduración y los que se encontraban en la segunda MII y/o con un cuerpo polar se clasificaron como madurados (Casas et al., 2010); la fertilización fue evaluada por la presencia de dos o más pronúcleos, o bien por el desarrollo embrionario (DE).

8.9 Evaluación del Desarrollo Embrionario

Una vez inseminados, los cigotos de las dos especies se transfirieron al medio de DE respectivo, para lo cual fueron lavados tres veces en gotas de 50 μ L. Los de porcino, en medio de desarrollo NCSU-23 suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0.4% y transferidos a gotas de 500 μ L del mismo medio. Los de ovino fueron lavados tres veces en medio SOF 1 y transferidos a este mismo medio e incubados durante 72 h, posteriormente fueron cambiados a medio SOF 2 en donde permanecieron hasta ser evaluados morfológicamente.

A las 72 h los embriones fueron observados para valorar si su estado de división correspondía con el tiempo de desarrollo esperado, posteriormente se incubaron 96 h más con el objeto de obtener blastocistos. Finalmente, los embriones fueron observados y clasificados de la siguiente forma: sin desarrollo, aquellos ovocitos no fertilizados, los de 2 a 8 blastómeros se conjuntaron en un sólo grupo y fueron considerados como embriones tempranos, aquellos con un número mayor de blastómeros fueron considerados como mórulas y los que tenían una cavidad o blastocele se consideraron como blastocistos; todos fueron evaluados mediante observación en un microscopio invertido (Olympus Optical) 50X, (Romo et al., 2008).

8.10 Evaluación del citoesqueleto

La integridad del citoesqueleto (microfilamentos de actina) fue evaluada en los ovocitos de porcino y ovino en diferentes momentos: al ser obtenidos después de puncionar a los folículos (frescos); después de la MIV (control); al momento de ser desvitrificados (tiempo cero de incubación); y por último, a las 44 horas de cultivo después de la desvitrificación.

Para llevar a cabo este procedimiento, los ovocitos fueron lavados en medio TL-HEPES-PVA modificado y para evaluar la integridad de los microfilamentos de actina; los ovocitos fueron incubados con isotiocianato de fluoresceína conjugado con faloidina-(1:1000) durante 1 h. Finalmente, los ovocitos fueron montados en PBS-glicerina (1:9), y se procedió a evaluar la presencia de los filamentos de actina mediante un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axiostar) a 400X. El mismo procedimiento de incubación con isotiocianato de fluoresceína conjugado con faloidina-(1:1000) durante 1 h fue usado para evaluar la integridad del citoesqueleto en los embriones de ambas especies, observando una coloración verde brillante en los que presentan el citoesqueleto íntegro y de color amarillo a café los que no lo tenían íntegro (Rojas et al., 2004)

8.11 Análisis Estadístico

Las diferencias obtenidas en 10 ensayos por cada tipo de muestra entre los recipientes de vitrificación, la viabilidad, la MIV, el DE y los resultados de la integridad del citoesqueleto se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrada. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$, (Kuehl, 2001; Wayne, 2008).

IX.- RESULTADOS

La viabilidad de los ovocitos de porcino fue evaluada en una muestra antes de proceder a su vitrificación, este grupo fue considerado como “control fresco”, el promedio de viabilidad fue de 95%. Por otra parte, el promedio de la viabilidad de los ovocitos inmediatamente después de la desvitrificación fue de 81% en cada uno de los recipientes. Después de la maduración de los ovocitos, la viabilidad del grupo control fue de 86%, en tanto que la viabilidad de los ovocitos vitrificados en pajilla SOPS fue del 17%, comparado con la BES en la que se obtuvo el 6% y en los Cryotop se obtuvo el 4% (Tabla 1), observándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control. Sin embargo en los resultados de viabilidad entre los grupos de ovocitos vitrificados en los tres tipos de recipientes utilizados no se observó ninguna diferencia significativa ($p > 0.05$).

La MIV de los ovocitos de porcino fue evaluada en una muestra en fresco (grupo control) en la que se obtuvo el 61% de maduración. Después de la desvitrificación los resultados obtenidos de la maduración de los ovocitos en Cryotop fue de 8%, seguida de los vitrificados en BES en la que se obtuvo el 6% y el menor porcentaje fue obtenido en pajilla SOPS que presentó el 3% (Tabla 1), en todos se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control. Entre los tres tipos de recipientes utilizados no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en la maduración después de la desvitrificación.

El DE de los ovocitos de porcino fue evaluado en una muestra en fresco (grupo control) en la cual se obtuvo el 25% de división. Los ovocitos desvitrificados no mostraron desarrollo.

TABLA 1. VIABILIDAD Y MADURACIÓN *IN VITRO* A 44 HORAS EN OVOCITOS DE PORCINO DESPUÉS DE LA DESVITRIFICACIÓN.

Tratamiento	Viabilidad (%)	Maduración (%)
Control fresco	196/227 (86) ^a	160/261 (61) ^a
BES (1 µL)	4/70 (6) ^b	6/106 (6) ^b
SOPS (0.5-1 µL)	13/77 (17) ^b	3/88 (3) ^b
Cryotop (<0.1 µL)	2/46 (4) ^b	4/51 (8) ^b

La evaluación de viabilidad y maduración fueron realizadas en diferentes muestras.

Valores con literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes $p < 0.05$.

La viabilidad de los ovocitos de ovino evaluada en una muestra antes de proceder a su vitrificación, fue de 95%. Por otra parte, la viabilidad de los ovocitos inmediatamente después de la desvitrificación fue de 90% en todos los recipientes.

Después de la maduración, el porcentaje de la viabilidad del grupo control fue de 86%, en tanto que los ovocitos vitrificados en pajilla SOPS presentaron el mayor porcentaje de viabilidad (30%), comparados con la BES y el Cryotop en las que se obtuvo el 21% (Tabla 2), observándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los ovocitos obtenidos en los tres tipos de recipientes con respecto al grupo control, sin embargo no se observó diferencia significativa entre los recipientes ($p > 0.05$).

La MIV en los ovocitos de ovino fue evaluada en una muestra en fresco (grupo control) en los que se obtuvo el 70%, también fue evaluada después de la desvitrificación y los resultados indicaron un mayor porcentaje de maduración de los ovocitos vitrificados en Cryotop en los que se obtuvo el 34%, seguido de los vitrificados en SOPS con 21% y el menor porcentaje (11%) se obtuvo en BES (Tabla 2), observándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control. Asimismo la maduración de los ovocitos vitrificados en Cryotop comparados con los de la BES presentaron una diferencia significativa ($p < 0.05$), sin embargo el resultado de la maduración entre los ovocitos vitrificados en SOPS con respecto a los otros dos tipos de recipientes no mostró diferencia significativa ($p > 0.05$).

El DE *in vitro* de ovocitos de ovino fue evaluado en una muestra en fresco (grupo control) en la que se obtuvo el 62%, posteriormente fueron clasificados en embriones de 2 a 8 blastómeros, mórulas y blastocistos; de acuerdo a esta clasificación los porcentajes de embriones obtenidos en fresco fueron 24%, 35% y 3%, respectivamente.

Después de la desvitrificación, los resultados obtenidos indicaron un mayor porcentaje (23%) de DE en los ovocitos obtenidos de pajillas SOPS, seguido de los de BES (13%) y el menor desarrollo (3%) se obtuvo en los de Cryotop, observándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el porcentaje de DE en el grupo control con relación al obtenido en los tres tipos de recipientes. Por otra parte

no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) al comparar el desarrollo entre los tres tipos de recipientes a las 168 h de cultivo. El estadio con mayor porcentaje de DE fueron las mórulas en los tres tipos de recipientes, siendo los obtenidos de pajilla SOPS los que presentaron el mayor porcentaje 17% (Tabla 2), sin embargo no fue diferente estadísticamente ($p > 0.05$) con los resultados de BES y Cryotop. Las SOPS fueron las únicas en las que hubo desarrollo de blastocistos (3%) después de la desvitrificación

TABLA 2. VIABILIDAD, MADURACIÓN *IN VITRO* A 24 HORAS Y DESARROLLO EMBRIONARIO A 168 HORAS EN OVOCITOS DE OVINO DESPUÉS DE LA DESVITRIFICACIÓN.

Tratamiento	Viabilidad (%)	Maduración (%)	Desarrollo de Embriones		
			2-8 Células	Mórulas	Blastocistos
Control fresco	48/56(86) ^a	52/74(70) ^a	63/263(24) ^a	92/263(35) ^a	8/263(3) ^a
BES (1 μ L)	16/75(21) ^b	8/75(11) ^c	6/94(6) ^b	6/94(6) ^b	0/94(0) ^b
SOPS (0.5-1 μ L)	10/33(30) ^b	7/33(21) ^{b,c}	10/115(9) ^b	13/115(17) ^b	4/115(3) ^a
Cryotop(<0.1 μ L)	11/53(21) ^b	14/41(34) ^b	0/32(0) ^b	1/32(3) ^b	0/32(0) ^b

La evaluación de viabilidad, maduración *in vitro* y desarrollo embrionario fueron realizadas en diferentes muestras.

Valores con literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes $p < 0.05$.

Los tres tipos de recipientes con un mínimo volumen de medio de vitrificación fueron utilizados para ovocitos de porcino y ovino, en los cuales fue evaluada la viabilidad e integridad de microfilamentos de actina en frescos y desvitrificados después de la MIV. Los resultados indican que los ovocitos de ambas especies presentaron una correlación directa entre la viabilidad y la fluorescencia positiva, todos los ovocitos que mostraron filamentos de actina con fluorescencia fueron viables.

Los ovocitos de porcino frescos presentaron 65% de viabilidad e integridad de filamentos de actina, en tanto que después de la desvitrificación y maduración de los ovocitos de porcino vitrificados en Cryotop se obtuvo el 24%, seguido del 16% de pajilla SOPS y el menor porcentaje (4%) correspondió a la BES (Tabla 3), observándose diferencia significativa $p < 0.05$ entre el grupo de frescos con los obtenidos en los tres tipos de recipientes; sin embargo los resultados entre los grupos de ovocitos vitrificados en los tres tipos de recipientes se observó una diferencia significativa $p < 0.05$ entre los obtenidos de la BES con los de Cryotop y SOPS.

El grupo de ovocitos de ovino frescos presentó el 82% de viabilidad e integridad de filamentos de actina, en tanto que después del calentamiento y maduración los vitrificados en pajilla SOPS tuvieron el 29%, seguido del 24% de la BES y el menor porcentaje (23%) correspondió a Cryotop (Tabla 3), observándose diferencia significativa $p < 0.05$ entre el grupo de frescos con los obtenidos en los tres tipos de recipientes; sin embargo en los resultados entre los grupos de ovocitos vitrificados en los tres tipos de recipientes no se observó diferencia significativa ($p < 0.05$).

En ambas especies, la viabilidad y la integridad de filamentos de actina fueron mayores en los ovocitos frescos que en los ovocitos desvitrificados. Para los ovocitos porcinos, cryotop fue el recipiente más eficaz (24%), mientras que SOPS fue el recipiente más eficaz (29%) en los ovocitos ovinos.

TABLA 3. VIABILIDAD E INTEGRIDAD DE MICROFILAMENTOS DE ACTINA EN OVOCITOS DE PORCINO Y OVINO, FRESCOS Y DESVITRIFICADOS, DESPUÉS DE LA MADURACIÓN *IN VITRO*.

Tratamiento	Ovocitos de porcino Maduración 44 horas	Ovocitos de ovino Maduración 24 horas
	Filamentos de actina fluorescentes (%) *	
Control fresco	148/217 (68) ^a	41/50 (82) ^a
BES (1 µL)	8/192 (4) ^c	21/88 (24) ^b
SOPS (0.5-1 µL)	23/148 (16) ^b	12/41 (29) ^b
Cryotop (<0.1 µL)	24/100 (24) ^b	14/60 (23) ^b

* Hubo una correlación directa entre viabilidad y fluorescencia. Todos los ovocitos que mostraron filamentos de actina con fluorescencia fueron viables.

Valores con literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes $p < 0.05$.

X.- DISCUSIÓN

Tanto para su aplicación biotecnológica como para las mejoras en la industria ganadera, es necesario tener la capacidad de almacenar un gran número de ovocitos. En los últimos años, varios experimentos han sido realizados para mejorar los procedimientos de vitrificación para la criopreservación de ovocitos. Debido a que un equipo de congelación es complejo y el proceso de criopreservación de células causa daños por la formación de cristales de hielo, la vitrificación es una alternativa que impide la formación de estos cristales y no requiere equipo especial. Por otra parte, la vitrificación de ovocitos inmaduros podría ser utilizada en los mamíferos domésticos y en los seres humanos (Isachenko et al., 2003; Isachenko et al., 2005). El reto actual sigue siendo la capacidad de lograr DE utilizando ovocitos inmaduros recuperados de la vitrificación, ya que son más sensibles que los ovocitos madurados-desvitrificados, esto específicamente en ovocitos porcinos (Varga et al., 2006; Shi et al., 2007; Somfai et al., 2010). Numerosas variables influyen en la eficiencia de la criopreservación: entre ellos se encuentran los crioprotectores, los recipientes, los volúmenes, los tiempos del procedimiento de vitrificación y las etapas de desarrollo, todos estos deben ser considerados para optimizar las técnicas para cada especie.

Hasta la fecha, los estudios no son concluyentes en la determinación de cual estado del ovocito tiene los mejores resultados en la vitrificación, ya sea en VG o en la

etapa de MII. Varios autores han demostrado que ovocitos en la etapa de VG de varias especies, como en humano (Boiso et al., 2002), bovino (Albarracin et al., 2005), porcino (Rojas et al., 2004) y equino (Hurt et al., 2000), son más susceptibles al procedimiento de vitrificación que los que están en estadio de MII (Succu et al., 2007). Sin embargo, el criodañó también ocurre en los ovocitos que se encuentran en esta fase de la división.

En porcino, algunos estudios han evaluado la viabilidad de los ovocitos de manera indirecta en función de criterios morfológicos, como son el citoplasma transparente, el daño a la membrana y la ZP o bien el éxito en la FIV (Succu et al., 2011). En el presente estudio, se determinó la viabilidad directamente mediante la evaluación de la actividad fisiológica de las mitocondrias con la tinción de MTT. Este método es más preciso que los parámetros morfológicos para evaluar la viabilidad, ya que mide la actividad metabólica de la célula. De acuerdo a los resultados del presente estudio, la viabilidad fue mayor del 90% después de la desvitrificación para ambas especies.

Para los ovocitos de porcino, la viabilidad en el momento de su llegada al laboratorio, fue superior al 90% y no se vio afectada después del período de maduración. Las tasas de viabilidad de los ovocitos vitrificados-desvitrificados después de 44 h de maduración (BES 6%, SOPS 17% y Cryotop 4%) fueron similares a los reportados por Huang y Holtz, (2002), ellos reportaron que el 4% de

los ovocitos en estado de VG eran viables después de la vitrificación, lo cual fue medido usando diacetato de fluoresceína observando que estos ovocitos no lograron llegar a la maduración. En nuestro caso la viabilidad después de la maduración, sobre todo en Cryotop, fue extremadamente variable (4, 24%; Tablas 1 y 3), por lo que se puede afirmar que definitivamente la criopreservación daña a los ovocitos.

La MIV en porcino fue del 61% en los ovocitos del grupo control, la cual es consistente con el porcentaje de maduración de 52 a 69% descrito por Abeydeera et al., (2000) y de 60% observado por Casas et al., (1999). De acuerdo con nuestras observaciones, el porcentaje de maduración de ovocitos vitrificados en etapa de VG fue de 3-8%. Huang y Holtz, (2002) evaluaron los efectos de diferentes crioprotectores y los medios de vitrificación en la capacidad de desarrollo de los ovocitos porcinos vitrificados en las etapas de VG y MII, en ninguno caso se obtuvo DE. Lo más probable es que murieran durante el proceso de vitrificación. Bali Papp et al., (2005) demostraron que después de la vitrificación, la membrana de la VG es dañada en la mayoría de los ovocitos. Varga et al., (2006) demostraron que los ovocitos rodeados de células foliculares tenían una mejor tasa de supervivencia (19%) que los ovocitos desnudos (13%). Recientemente, Somfai et al., (2010) obtuvieron blastocistos mediante FIV de ovocitos foliculares vitrificados en la etapa de VG. Ellos reportan 21% de los ovocitos en MII después de la desvitrificación y 5% de los blastocistos producidos fueron viables. Por lo tanto, los ovocitos porcinos en diferentes etapas de la meiosis responden de manera diferente al proceso de

criopreservación. En etapa de MII aparentemente son más resistentes a la criopreservación que los ovocitos en etapa de VG, por el estado en que se encuentra su cromatina.

El DE en el grupo control porcino fue de 25%, siendo similar al descrito por Ducolomb et al., (2005). Sin embargo, a pesar del porcentaje observado de viabilidad y maduración, no hubo DE. Esto puede explicarse porque los ovocitos y embriones de cerdos se caracterizan por su alto contenido de lípidos que se almacena en forma de gotas en el citoplasma, lo que los hace diferentes a los de otras especies de mamíferos. Este alto contenido en lípidos tiene una influencia negativa en la manipulación exitosa de los ovocitos y embriones de porcino, posiblemente a la relación que tienen los lípidos en la osmorregulación (Saragusty y Arav, 2011), lo que resulta en que los métodos de criopreservación sean menos exitosos en porcinos que en la especie bovina (Gajda, 2009). Estos resultados son similares a los bajos porcentajes de DE reportados por Nagashima et al., (1999) y Wu et al., (2006), o la baja formación de blastocistos encontrada por Somfai et al., (2010).

Hay una variedad de estrategias de criopreservación utilizadas para producir crías de porcino a partir de ovocitos vitrificados en etapas de VG o MII. Para reducir al mínimo el volumen de las soluciones de vitrificación tanto como sea posible, se han utilizado recipientes que mejoran el proceso de vitrificación, evitando la formación de

cristales de hielo. Substancias como el taxol (Shi et al., 2006) y la citocalasina B (Fujihira et al., 2004) se han empleado para lograr la estabilidad del citoesqueleto y para reducir el daño al huso meiótico (Zhou y Li, 2009). Como los cambios físicos en los lípidos a diferentes temperaturas de congelación son considerados las principales causas de criodañó celular, los ovocitos porcinos han sido delipidados en la etapa de VG para mantener la viabilidad y reanudar la meiosis (Nagashima et al., 1999; Men et al., 2006). Se ha tenido poco éxito en el DE utilizando ovocitos inmaduros o madurados después de la criopreservación, en su mayoría debido a los daños producidos en las estructuras celulares. A pesar de las mejoras en la supervivencia y los porcentajes de desarrollo, no se ha logrado producir lechones a partir de ovocitos porcinos criopreservados (Somfai et al., 2010). A pesar de que se han desarrollado una combinación de metodologías para mejorar la competencia de los ovocitos vitrificados, los resultados siguen siendo controvertidos. Por lo tanto, es necesario continuar la investigación con el fin de optimizar los métodos de vitrificación de ovocitos, logrando tasas más altas de viabilidad, maduración y DE, y en última instancia la obtención de crías vivas.

En los ovocitos de ovino, la viabilidad en el momento de su llegada al laboratorio fue superior al 90% y no se vio afectada después del período de maduración. Sin embargo las tasas de viabilidad de los ovocitos vitrificados-desvitrificados después de 24 h de maduración (BES 21%, SOPS 30% y cryotop 21%) fueron similares a los reportados por Bogliolo et al., (2007) en condiciones similares al presente estudio;

ellos examinaron la competencia meiótica de ovocitos vitrificados y reportaron 84% de viabilidad después de la desvitrificación, sin embargo existen pocos estudios utilizando ovocitos inmaduros para la vitrificación, subsecuente maduración y posterior DE. En el presente estudio la viabilidad después de la maduración, sobre todo en SOPS, fue mayor que en los otros dos recipientes y los porcentajes de viabilidad obtenidos en ovino fueron mayores a los obtenidos en porcino.

La MIV en ovino fue del 70% en los ovocitos del grupo control, la cual fue similar al 72% reportado por Byrd et al., (1997) y el 60-86% citado por Kochhar et al., (2002). Por otra parte Silvestre et al., (2006) evaluaron el efecto de citocalasina B antes de la vitrificación sobre la capacidad de los ovocitos inmaduros de oveja para pasar a la etapa de MII después del procedimiento de vitrificación. Ambos grupos de ovocitos inmaduros, con y sin tratamiento con citocalasina B antes de la vitrificación alcanzaron menores porcentajes de MII (8% y 12%, respectivamente) que su grupo control (79%), por lo que llegaron a la conclusión de que la citocalasina B no ofrece ningún efecto crioprotector. La criopreservación de ovocitos en esta especie se ha intentado con grados variables de éxito. La mayoría de estos estudios se han realizado en ovocitos madurados *in vitro* (MII) (Succu et al., 2007; Berlinguer et al., 2007; Succu et al., 2008; Zhang et al., 2009; Succu et al., 2011).

El DE en ovino, en el grupo control fue de 61%, similar al 60% reportado por Succu et al., (2007). En ovino se han tratado de obtener blastocistos evaluando

indirectamente la viabilidad y la maduración, sin embargo no hay avances significativos en la producción de blastocistos a partir de ovocitos y en algunos casos, no se logró el desarrollo de blastocistos (Succu et al., 2007). Cuando se fertilizaron ovocitos de ovino vitrificados en MII, el porcentaje de formación de blastocistos fue bajo (1-3%). Utilizando diferentes concentraciones de citocalasina B o taxol antes de la vitrificación, aumentó el porcentaje en la formación de blastocistos al 8% y 10%, respectivamente (Zhang et al., 2009).

En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de tres recipientes en el proceso de vitrificación en ambas especies, a través de la presencia de filamentos de actina, que está relacionada con la viabilidad de los ovocitos. En el caso de los ovocitos porcinos, las SOPS y Cryotop fueron más eficientes que la pajilla BES con base en el aumento del porcentaje de viabilidad y la presencia de filamentos de actina. En los ovocitos de la especie ovina, no se observaron diferencias entre recipientes.

Los resultados obtenidos muestran un menor porcentaje en la viabilidad y la presencia de filamentos de actina de los ovocitos madurados después de la vitrificación en porcino y ovino, lo cual puede ser debido a que la vitrificación está asociada con varias alteraciones de los ovocitos como son: microtúbulos anormales y la polimerización de microfilamentos (Rojas et al., 2004), modificación de la estructura de la bicapa de la membrana plasmática (Fuku et al., 1995; Arav et al., 1996), desorganización del huso y aneuploidía (Liu et al., 2003), aberraciones

cromosómicas (Men et al., 2003), alteración de la distribución de los gránulos corticales (Mavrides y Morrol, 2005) y la muerte celular (Succu et al., 2007).

Se tiene conocimiento de que la vitrificación de ovocitos porcinos inmaduros en etapa de VG al no tener el huso meiótico organizado reduce en un 10% su organización, en tanto que en los ovocitos vitrificados en etapa de MII la organización normal del huso se reduce en un 12% (Wu et al., 2006). Además de la alteración en la localización y organización de los microtúbulos los ovocitos vitrificados en MII muestran alterada la organización mitocondrial, disminuyendo la fertilización y el DE (Shi et al., 2007). Lo anterior indica que los ovocitos en etapa de VG tienen mayor posibilidad de resistir el proceso de vitrificación. Sin embargo, otros investigadores reportan que en forma independiente del estado de desarrollo, los ovocitos porcinos sufren daño irreversible después de la vitrificación, sobre todo en la configuración del huso meiótico (Shi et al., 2006).

En ovinos, Succu et al., (2007) evaluaron el estado estructural y molecular de la MIV de ovocitos y relacionaron el efecto de la vitrificación en diferentes recipientes con la configuración del huso, organización de los cromosomas, actividad del factor promotor de la maduración y DE. Ellos demostraron que, dependiendo del recipiente utilizado, la criopreservación afecta en forma diferente la estructura del huso, observando el 7% de los ovocitos con un huso normal en OPS, 17% en Cryotop, y 37% en Cryoloop. En tanto que los porcentajes de la integridad de filamentos de

actina obtenidos en ovocitos de ovino en el presente trabajo fue similar en los tres tipos de recipientes Cryotop (23%), BES (24%) y SOPS (29%). Posiblemente se debe a la calidad de la muestra al momento de realizar el ensayo.

De los recipientes utilizados en el presente trabajo el Cryotop es el que requiere menor volumen de medio de vitrificación. Este recipiente ha sido desarrollado y utilizado ampliamente en la vitrificación de ovocitos humanos (Kuwayama et al. 2005). Debido a lo anterior se emplearon el Cryotop y la BES, esta última fue elaborada con una pajilla de 0.25 mL a la cual se le adaptó un bisel para recibir una gota de 1 μ L en la que se colocan los ovocitos. Los resultados obtenidos fueron similares en estos dos tipos de recipientes en cuanto a viabilidad. Con el Cryotop se logró el mayor porcentaje de MIV en las dos especies y el DE fue mayor cuando los ovocitos se vitrificaron en la pajilla SOPS.

La susceptibilidad a la vitrificación es diferente en cada especie. Los resultados aquí descritos muestran que los niveles de maduración y DE fueron mayores en ovocitos ovinos que en ovocitos porcinos. En ovino se obtuvieron mórulas en los tres recipientes. De estos, la SOPS proporcionó el mayor índice de formación de mórulas (17%) y fue el único a partir del cual se desarrollaron blastocistos (3%) en esta especie, posiblemente porque la hidratación al momento de la desvitrificación es más constante, el contacto con el medio de desvitrificación se retrasa unos segundos en comparación con los otros recipientes. De acuerdo con estos

resultados, en ovinos es posible criopreservar un mayor número de ovocitos inmaduros que pueden llegar a la maduración y posteriormente al desarrollo de embriones. Estos resultados sugieren que la reducción del volumen de los crioprotectores es necesaria para conservar la viabilidad, como lo describen Arav et al., (2002).

XI.- CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó que después de la desvitrificación con los ovocitos de ovino se obtuvieron mayores porcentajes de viabilidad, MIV y DE que los de porcino.

La SOPS fue el recipiente en el cual se obtuvieron los mejores resultados en el DE después de la desvitrificación de los ovocitos de ovino.

Tanto con el Cryotop como con la BES se obtuvieron porcentajes de viabilidad similares en las dos especies, sin embargo con el Cryotop se obtuvieron mayores porcentajes de MIV.

La BES mostró ser un recipiente adecuado para llevar a cabo la vitrificación de ovocitos ovinos con la que se logró el DE.

La BES tiene la ventaja de ser un recipiente de bajo costo, diez y cien veces menor del valor de la SOPS y del Cryotop respectivamente.

XII.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Abe, Y., Hara, K., Matsumoto, H., Kobayashi, J., Sasada, H., Ekwall, H., Rodríguez-Martinez, H., Sato, E. 2005. Feasibility of a nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol. Reprod.* 72: 1416-1420.

- 2.- Abeydeera, L.R., Day, B.N. 1997. In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48: 537-544.

- 3.- Abeydeera, L.R., Wang, W., Pather, R.S., Day, B.N. 1998a. Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: Fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 58: 1316-1320.

- 4.- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Cantley, T.C., Reike, A., Prather, R.S., Day, B.N. 1998b. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 51:395-401.

- 5.- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Cantley, T.C., Rieke, A., Murphy, C.N., Prather, R.S., Day, B.N. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 54: 787-797.
- 6.- Agca, Y., Liu, J., Rutledge, J.J., Crister, E.S., Crister, J.K. 2000. Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 55:212-219.
- 7.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. 3^a. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. pp. 43-62, 69-77.
- 8.- Al-aghbari, A.M., Menino, A.R. 2002. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Anim. Reprod. Sci.* 71: 101-110.
- 9.- Albarracin, J.L., Morato, R., Izquierdo, D., Mogas, T. 2005. Vitrification of calf oocytes: effects of maturation stage and prematuration treatment on the nuclear and cytoskeletal components of oocytes and their subsequent development. *Mol. Reprod. Dev.* 72: 239-249.

- 10.- Arav, A., Zeron, Y., Leslie, S.B., Behboodi, E., Anderson, G.B., Crowe, J.H. 1996. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology* 33: 589-599.
- 11.- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol. Cell. Endocr.* 187: 77-81.
- 12.- Asada, M., Ishibashi, S., Ikumi, S., Fukui, Y. 2002. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) cocentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology* 58: 1199-1208.
- 13.- Austin, C.R., Short, R.V. 1982. Procesos de reproducción en los mamíferos. Células germinales y fertilización. La Prensa Médica Mexicana, S.A. México, D.F. 1: 15-48.
- 14.- Bali Papp, A., Somfai, T., Varga, E., Marosán, M. 2005. Survival of porcine oocyte at germinal vesicle stage after vitrification with open pulled straw method. *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 189.
- 15.- Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A., Keefer, C.L. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2-to 4-cell embryos using

cryoloop (CVL) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59: 1839-1950.

16.- Berlinguer, F., Succu, S., Mossa, F., Madeddu, M., Bebbere, D., Leoni, G.G., Naitana, S. 2007. Effects of trehalose co-incubation on in vitro matured prepubertal ovine oocyte vitrification. *Cryobiology* 55: 27-34.

17.- Betancourt, M., Fierro, R., Ambriz, D. 1993. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 40: 1155-1160.

18.- Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Rosati, I., Zedda, M.T., Leoni, G., Succu, S., Pau, S., Ledda, S. 2007. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology* 68: 1138-1149.

19.- Boiso, I., Marti, M., Santalo, J., Ponsa, M., Barri, P.N., Veiga, A. 2002. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum. Reprod.* 17: 1885-1891.

20.- Byrd, S.R., Flores-Foxworth, G., Applewhite, A.A., Westhusin, M.E. 1997. In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology* 47: 857-864.

- 21.- Casas, E., Betancourt, M., Bonilla, E., Ducolomb, Y., Zayas, H., Trejo, R. 1999. Changes in cyclin B localization during pig oocyte in vitro maturation. *Zygote* 7: 21-26.
- 22.- Casas, E. Bonilla E., Ducolomb Y. Betancourt M. 2010. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in Vitro* 24: 224-230.
- 23.- Cocero, M.J., Sebastian, A.L., Barragan, M.L. Picazo, R.A. 1996. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology* 33:502-507.
- 24.- Conejo, N.J. 2003. Estado funcional de la membrana, capacitación in vitro, reacción acrosomal y capacidad de fertilización in vitro de espermatozoides porcinos almacenados en un diluyente de larga duración. Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F.
- 25.- Corti, R.H. 2006. Criopreservación...¿y después? Soluciones acuosas sobreenfriadas y vitrificadas. *Rev. Cien. Hoy* 15: 26-39.

- 26.- Cuello, C., Gil, M.A., Parrilla, I., Tornel, J., Vázquez, J.M., Roca, J., Berthelot, F., Martinat-Botté, F., Martínez, E.A. 2004. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* 62: 1144-1152.
- 27.- Dattena, M., Ptak, G., Loi, P., Cappai, P. 2000. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocyst. *Theriogenology* 53: 1511-1519.
- 28.- Diez, C., Duque, P., Gomez, E., Hidalgo, C.O., Tamargo, C., Rodríguez, A., Fernández, L., De la Varga, S., Fernández, A., Facal, N., Carbajo, M. 2005. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology* 64: 317-333.
- 29.- Dobrinsky, J.R., Pursel, V.G., Long, C.R., Johnson, L.A. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 62: 564-570.
- 30.- Ducolomb, Y., Fierro, R., González-Márquez, H., Valdez, A., Betancourt, M. 2003. Effect of porcine follicular fluid on in vitro maturation oocytes, in vitro fertilization and polyspermy. *Adv. Reprod.* 7: 1-6.

- 31.- Ducolomb, R.Y.C., Romo, G.S., Balcázar, S.J.A., Rodarte, C.L.F., Casas, H.E., Fragoso, G.G.C., Sciutto, C.E.L., Betancourt, R.M. 2005. Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. *Téc. Pec. Méx.* 43: 425-432.
- 32.- Eppig, J.J. 1993. Regulation of mammalian oocyte maturation. In the ovary. E.Y. Adashi and P.C.K. Leung. New York, USA. pp. 185-208.
- 33.- Esaki, R., Veda, H., Kurome, M., Hirakawa, K., Tomii, R., Yoshioka, H., Ushijima, H., Kuwayama, M., Nagashima, H. 2004. Criopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matures oocytes. *Biol. Reprod.* 71: 432-437.
- 34.- Foxcroft, G.R., Hunter, M.G., Dobererska, C. 1993. Control of pig reproduction IV. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 48)*.
- 35.- Freshney, R.I. 1987. Culture of animal cells. A manual of basic techniques. 2a. Alan R. Liss. New York, USA. pp. 69-75.
- 36.- Fujihira, T., Kishida, R., Fukui, Y. 2004. Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI, effects of Cytochalasin B and crioprotectants. *Cryobiology* 49: 286-290.

- 37.- Fujihira, T., Nagai, H., Fukui, Y. 2005. Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of Taxol treatment for vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Cryobiology* 51: 339-343.
- 38.- Fuku, E., Xia, L., Downwy, B.R. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 32: 139-156.
- 39.- Gajda, B. 2009. Factors and methods of pig oocyte and embryo quality improvement and their application in reproductive biotechnology. *Reprod. Biol.* 9: 97-112.
- 40.- Gardner, D.K. 2008. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 9-18.
- 41.- Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J.M., Roca, J., Martinez, E.A. 2010. Advances in swine in vitro embryo production technologies. *Reprod. Dom. Anim.* 45(Suppl. 2): 40-48.
- 42.- Gordon, I. (1994). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cab International. Wallingford. Oxon, UK.

- 43.- Grazul-Bilska, A.T., Choi, J.T., Bilski, J.J., Weigl, R.M., Kirsch, J.D., Kraft, C., Reynolds, L.P., Redmer, D.A. 2003. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after in vitro fertilization of oocytes. Collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 59: 1449-1457.
- 44.- Gupta, M.K., Uhm, S.J., Lee, H.T. 2007. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology* 67: 238-248.
- 45.- Hafez, E.S.E., Hafez, B. 2003. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª. Mc Graw Hill. México, D.F. pp. 441-452.
- 46.- Hasegawa, A., Hamada, Y., Mehandjiev, T., Koyoma, K. 2004. In vitro growth and maturation as well as fertilization of mouse preantral oocytes from vitrified ovaries. *Fert. Steril.* 81(suppl. 1): 824-830.
- 47.- Hochi, S., Ito, K., Hirabayashi, M., Ueda, M., Kimura, K., Hanada, A. 1998. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. *Theriogenology* 49: 787-796.
- 48.- Hochi, S. 2003. Cryopreservation of follicular oocyte and preimplantation embryos in cattle and horses. *J. Reprod. Dev.* 49: 13-21.

49.- Hotamisligil, S., Toner, M., Powers, D. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod.* 55: 161-168.

50.- Huang, W.T., Holtz, W. 2002. Effects of meiotic stages, cryopreservants, cooling and vitrification on the cryopreservation of porcine oocytes. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 15: 485-493.

51.- Huang, J., Li, Q., Zhao, R., Li, W., Han, Z., Chen, X., Xiao, B., Wu, S. Jiang, Z., Hu, J., Liu, L. 2008. Effect of sugars on maturation rate of vitrified-thawed immature porcine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 106: 25-35.

52.- Hunter, M.G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev. Reprod.* 5: 122-130.

53.- Hurt, A.E., Landim-Alvaregan, F., Seidel, G.E.Jr., Squires, E.L. 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 54: 119-128.

- 54.- Illera, M.J., Lorenzo, P.L., Illera, J.C., Petters, R.M. 1998. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-I, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 1169-1172.
- 55.- Isachenko, V., Alabart, J.L., Dattena, M., Nawroth, F., Cappai, P., Isachenko, E., Cocero, M.J., Olivera, J., Roche, A., Accardo, C., Krivokharchenko, A., Folch, J. 2003. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology* 59: 1209-1218.
- 56.- Isachenko, V., Montag, M., Isachenko, E., Zaeva, V., Krivokharchenko, I., Shafei, R., Van der Ven, H. 2005. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum. Reprod.* 20: 492-496.
- 57.- Jain, J.K., Paulson, R.J. 2006. Oocyte cryopreservation. *Fertil. Steril.* 86(Suppl. 3): 1037-1046.
- 58.- JennFa, L., JingDer, L., HsiuMei, L., MingChe, W., LihRen, C. 2002. Cumulus removal and different cryoprotectants effects on porcine oocytes vitrification. *J. Taiw. Livest. Res.* 35: 357-365.

- 59.- Kawakami, M., Kato, Y., Tsunoda, Y. 2008. The effects of time of first cleavage, developmental stage, and delipidation of nuclear-transferred porcine blastocysts on survival following vitrification. *Anim. Reprod. Sci.* 106: 402-411.
- 60.- Kochhar, H.P.S., Wu, B., Morris, L.H.A., Buckrell, B.C., Pollard, J.W., Basrur, P.K., King, W.A. 2002. Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 19-25.
- 61.- Kuehl, R.O. 2001. *Diseño de Experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de Investigaciones.* 2ª. Thomson Learning. México, D.F.
- 62.- Kuwayama, M., Holm, H., Jacobsen, H., Greve, T. Callesen, H. 1997. Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification. *Vet. Rec.* 141: 365.
- 63.- Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, S.P. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 11: 300-308.
- 64.- Lane, M., Scholcraft, W.B., Gardener, D.K. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.* 72: 1073-1078.

65.- Ledda, S., Bogliolo, L., Succu, S., Ariu, F., Bebbere, D., Leoni, G.G., Naitana, S. 2007. Oocyte cryopreservation: oocyte assesement and strategies for improving survival. *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 158.

66.- Lee, G.S., Kim, H.S., Hyun, S.H., Jeon, H.Y., Nam, D.H., Jeong, Y.W., Kim, S., Kim, J.H., Kang, S.K. Lee, B.C., Hwang, W.S. 2005. Effect of epidermal growth factor in preimplantation development of porcine cloned embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 71: 45-51.

67.- Leoni, G.G., Berlinguer, F., Succu, S., Bebbere, D., Mossa, F., Madeddu, M., Ledda, S., Bogliolo, L., Naitana, S. 2008. A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 373-382.

68.- Liu, R.H., Sun, Q.Y., Li, H.Y., Jiao, L.H., Wang, W.H. 2003. Effects of cooling on meiotic spindle structure and chromosome alignment within in vitro matured porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 65: 212-218.

69.- Liu, Y., Du, Y., Lin, L., Li, J., Kragh, P.M., Kuwayama, M., Bolund, L., Yang, H., Vajta, G. 2008. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and cryotop vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. *Cryo Letter* 29: 315-320.

- 70.- Lundy, T., Smith, P., O'Connell, A., Hudson, N.L., McNatty, K.P. 1999. Populations of granulose cells in small follicles of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil.* 115: 252-262.
- 71.- Marina, S., Marina, F., Torres, P.J., Fosas, N., Martin, P., Alcolea, R., Pérez, N., Fernández, S., Arrendó, N., Jové, I., Hochman, M., Suñol, J. 2002. Congelación de ovocitos para reproducción asistida: Revisión. *Rev. Iberoam. Fétil.* 19: 59-68.
- 72.- Martinez, A.G., Matkovic, M. 1998. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 49: 1039-1049.
- 73.- Mavrides, A., Morroll, D. 2002. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete?. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 73-80.
- 74.- Mavrides, A., Morroll, D. 2005. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 118: 67-70.
- 75.- Melo, R.V., Cuamatzi, T.O. 2004. *Bioquímica de los procesos metabólicos.* Reverté, S.A. México, D.F.

- 76.- Men, H., Monson, R.L., Rutledge, J.J. 2002. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocytes resistance to cryopreservation. *Theriogenology* 57: 1095-1103.
- 77.- Men, H., Monson, R.L., Parrish, J.J., Rutledge, J.J. 2003. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 245-250.
- 78.- Men, H., Agca, Y., Riley, L.K., Critser, J. 2006. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology* 66: 2008-2016.
- 79.- MingChe, W., HsiuMei, L., YahShin, L., TsueyYun, C. JarRer, C. 1999. Survival rate of porcine oocytes recovered from ultrarapid frozen-thawed ovaries. *J. Taiw. Livest. Res.* 32: 1-15.
- 80.- Morató, R., Izquierdo, D., Paramio, M.T., Mogas, T. 2008. 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: 137-141.

81.- Mori, T., Amano, T., Shimizu, H. 2000. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Biol. Reprod.* 62: 913-919.

82.- Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55–63.

83.- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.K., Rodwell, V.M. 2004. *Harper Bioquímica Ilustrada.* 16ª. Ed. Manual Moderno. México, D.F.

84.- Nagashima, H., Cameron, R.D.A., Kuwayama, M., Young, M., Beebe, L., Blackshaw, A.W., Nottle, M.B. 1999. Survival of porcine delipated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification. *J. Reprod. Dev.* 45: 167-176.

85.- Nagashima, H., Himura, K., Saito, H., Tomii, R., Ueno, S., Nakayama, N., Matsunari, H., Kurome, M. 2007. Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol. Reprod.* 76: 900-905.

86.- Naitana, S., Ledda, S., Loi, P., Leoni, G., Bogliolo, L., Dattena, M., Cappai, P. 1997. Poliviny alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming

solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 247-256.

87.- Petters, R.M., Wells, K.D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl. 48): 61-73.

88.- Pereira, R.M., Marques, C.C. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tiss. Bank.* 9: 267-277.

89.- Picton, H.M., Danfour, M.A., Harris, S.E., Chambers, E.L. and Huntriss. 2003. Growth and maturation of oocytes in vitro. *Reproduction* (Suppl. 61): 445-462.

90.- Revel, A., Moshe, N., Helman, A., Safran, A., Simon, A., Koler, M. 2004. Mouse embryos generated from frozen-thawed oocytes can successfully survive a second cryopreservation. *Hum. Reprod.* 19: 666-669.

91.- Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M.P., Lonergan, P. 2002. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 62: 320-327.

- 92.- Rojas, C., Palomo, M.J., Albarracín, J.L., 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.
- 93.- Romo, S., Ducolomb, Y.C., Álvarez, A.L., González, F. 2008. Guía fotográfica para la evaluación de embriones bovinos. XXXII Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, Ver. pp. 468-473.
- 94.- Rosales, T.A., Rosado, A. 1989. Bioquímica de la maduración folicular en el mamífero. *Ciencia* 40: 275-288.
- 95.- Saragusty, J., Arav, A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141: 1-19.
- 96.- Sato, E., Yokoo, M. 2005. Morphological and biochemical dynamics of porcine cumulus oocyte complexes: role of cumulus expansion in oocyte maturation. *Ital. J. Anat. Embryol.* 110 (Suppl. 2): 205-217.
- 97.- Seguino, M., Ikeda, M., Aoki, S. Tokieda, Y., Hirahara, F., Sato, K. 2003. In vitro culture of mouse GV oocytes and preantral follicles isolated from ovarian tissues cryopreserved by vitrification. *Hum. Cell.* 3: 109-116.

98.- Shi, W.Q., Zhu, S.E., Zhang, D., Wang, W.H., Tang, G.L., Hou, Y.P., Tian, S.J. 2006. Improved development by Taxol pretreatment alters vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Reproduction* 131: 795-804.

99.- Shi, L.Y., Jin, H.F., Kim, J.G., Mohana Kumar, B., Balasubramanian, S., Choe, S.Y., Rho, G.J. 2007. Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Anim. Reprod. Sci.* 100: 128-140.

100.- Sigma. 2006-2007. Bioquímica, reactivos y kits. Para la investigación en Ciencias de la Vida. México. pp 867-868.

101.- Silvestre, M.A., Yaniz, J., Salvador, I., Santolaria, F., Lopez-Gatius, F. 2006. Vitrification of pre-puberal ovine cumulus-oocyte complexes: Effect of cytochalasin B pre-treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 176-182.

102.- Somfai, T., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Nakai, M., Maedomari, N., Ito, J., Kashiwazaki, N., Nagai, T., Kikuchi, K. 2009. Live piglets derived from in vitro-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol. Reprod.* 80: 42-49.

103.- Somfai, T., Noguchi, J., Kaneko, H., Nakai, M., Ozawa, M., Kashiwazaki, N., Egerszegi, I., Ratky, J., Nagai, T., Kikuchi, K. 2010. Production of good-quality

porcine blastocysts by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 73: 147-156.

104.- Songsasen, N., Buckrell, B.C., Plante, C., Leibo, S.P. 1995. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology* 32: 78-91.

105.- Stock, A.E., Woodruff, T.K., Smith, L.C. 1997. Effects of inhibin A and Activin A during in vitro maturation of bovine oocytes in hormone and serum-free medium. *Biol. Reprod.* 56: 1559-1564.

106.- Succu, S., Leoni, G.G., Bebbere, D., Berlinguer, F., Mossa, F., Bogliolo, L., Madeddu, M., Ledda, S., Naitana, S. 2007. Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 1337-1344.

107.- Succu, S., Bebbere, D., Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Leoni, G.G., Berlinguer, F., Naitana, S., Ledda, S. 2008. Vitrification on in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pre-implantation development and relative mRNA abundance. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 538-546.

108.- Succu, S., Berlinguer, F., Leoni, G.G., Bebbere, D., Satta, V., Marco-Jimenez, F., Pasciu, V., Naitana, S. 2011. Calcium concentration in vitrification medium affects

the developmental competence of in vitro matured ovine oocytes. *Theriogenology* 75: 715-721.

109.- Tharasanit, T., Colenbrander, B., Stout, T.A. 2006a. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 627-627.

110.- Tharasanit, T., Colleoni, S., Lazzari, G., Colenbrander, B., Galli, C., Stout, T.A. 2006b. Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. *Reproduction* 132: 759-769.

111.- Tharasanit, T., Colleoni, S., Galli, C., Colenbrander, B., Stout, T.A. 2009. Protective effect of the cumulus-corona radiate complex during vitrification of horse oocytes. *Reproduction* 137: 391-401.

112.- Tucker, M.J., Shipley, S., Liebermann, J. 2004a. Conventional technologies for cryopreservation of human oocytes and embryos. *Methods Mol. Biol.* 254: 325-344.

113.- Tucker, M., Morton, P., Liebermann, J. 2004b. Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113(Suppl. 1): S24-27.

- 114.- Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim. Reprod. Sci. 60: 357-364.
- 115.- Varga, E., Gardón, J.C., Bali Papp, A. 2006. Effect of open pulled straw (OPS) vitrification on the fertilization rate and developmental competence of porcine oocytes. Acta Vet. Ung. 54: 107-116.
- 116.- Velázquez, C.G. 2009. Fisiología de la reproducción humana. Rev. Mex. Med. Reprod. 1: 115-130.
- 117.- Wang, W., Niwa, K. (1995). Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. Zygote 3: 345-350.
- 118.- Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Cantley, T.C. Day, B.N. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. J. Reprod. Fertil. 111: 101-108.
- 119.- Wang, Z., Sun, Z., Chen, Y., He, F. 2009. A modified cryoloop vitrification protocol in the cryopreservation of mature mouse oocytes. Zygote 17: 217-224.

120.- Wani, N.A., Wani, G.M., Khan, M.Z., Salahudin, S. 2000. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Rum. Res.* 36: 63-67.

121.- Wani, N.A. 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rum. Res.* 44: 89-95.

122.- Wayne, W.D. 2008. *Biostatística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud.* 4ª. LIMUSA, México, D.F. pp. 588-599.

123.- WeiTung, H., Holtz, W. 2002. Effects of meiotic stages, cryoprotectants, cooling and vitrification on the cryopreservation of porcine oocytes. *Asian-Australasian J. Ani. Sci.* 15: 485-493.

124.- Wheeler, M.B., Clark, S.G., Beebe, D.J. 2004. Development in *in vitro* technologies for swine embryos production. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 15-25.

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

126.- Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M., Pursel, V.G. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: Relevance to the ability to form male pronucleus. *Biol. Reprod.* 49: 89-94.

127.- Zhang, J., Medambale, T.L., Yang, M., Li, J. 2009. Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 46-55.

128.- Zhao, X., Dai, W., Zhu, H., Zhang, Y., Cao, L., Ye, Q., Lei, P., Shen, G. 2006. Epidermal growth factor (EGF) induces apoptosis in a transfected cell line expressing EGF receptor on its membrane. *Cell. Biol. Int.* 30: 653-658.

129.- Zhou GB, Li N. 2009. Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. *Mol. Hum. Reprod.* 15: 279-285.

130.- Zhu, S.E., Zeng, S.M., Yu, W.L., Li, S.J., Zhang, Z.C., Chen, Y.F. 2001. Vitrification of in vivo and in vitro produce ovine blastocysts. *Anim. Biotechnol.* 12: 193-203.

ANEXOS

ANEXO 1

ABREVIATURAS:

BES: Pajilla modificada biselada

BSA: albúmina de suero bovino

COCs: Complejo ovocito-células del cúmulo

DPBS: Solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco

DE: Desarrollo de embriones

FCS: Suero fetal bovino

VG: Vesícula germinal

FIV: Fertilización in vitro

HEPES: *(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)*

MMII: Metafase II

mTBM: Medio amortiguado con Tris modificado

MTT: Azul de tetrazolio

NCSU-23: Medio North Carolina State University-23

OPS: Open Pulled Straw: Pajilla abierta estirada

PVA: Alcohol polivinílico

SOPS: Super Open Pulled Straw: Pajilla abierta super estirada

TCM-199: Medio de cultivo de tejidos 199

TL: Medio de Tyrode con lactato

TL-HEPES-PVA: Medio modificado Tyrode con lactato, HEPES y alcohol polivinílico

ANEXO 2

COMPONENTES EN LOS MEDIOS DE CULTIVO DE OVOCITOS Y EMBRIONES

Después de la desvitrificación, para el cultivo de los ovocitos se utiliza el medio TCM199, al que se adiciona cisteína, que es el precursor del glutatión (GSH). La permeabilidad de la membrana es baja para GSH y depende de la concentración de cisteína (Foxcroft et al., 1993). El GSH es el mayor tiol libre que tiene funciones biológicas importantes durante la proliferación celular, como el transporte de aminoácidos, la síntesis de proteínas y ADN, reduce puentes disulfuro y protege a las células contra la oxidación (Yoshida et al., 1993).

La adición de aminoácidos esenciales y no esenciales a los medios de cultivo de células es de uso general (Gardner, 2008). Se ha propuesto que los aminoácidos sirven como osmoreguladores, osmoprotectores, reguladores de pH, fuente de energía y para la síntesis de proteína (Foxcroft et al., 1993).

La glucosa es incluida en muchos medios como fuente de energía, es metabolizada principalmente por la glicolisis para formar piruvato, el cual se transforma a lactato o aceto-acetato y entra al ciclo del ácido cítrico para formar CO₂ (Freshney, 1987).

El calcio es importante para la maduración del ovocito, en forma libre tal vez actúa por vía dependiente de calmodulina, activa a la cAMP fosfodiesterasa disminuyendo

la concentración de cAMP, lo que ocasiona una disminución del umbral requerido para mantener el detenimiento de la meiosis e inicia la cascada de eventos que finalmente causa el rompimiento de la vesícula germinal (RVG) (Eppig, 1993); se ha observado que el calcio es el ión regulador más importante en la penetración espermiática en ovocitos *in vitro* (Abeydeera y Day, 1997).

Las gonadotropinas inducen el RVG *in vivo*, el pico preovulatorio de LH induce el RVG, en tanto que este proceso se produce cuando esta hormona está presente en el cultivo de folículos intactos, no hay receptores de LH en los ovocitos, por consiguiente, el RVG puede deberse a un pulso transmitido por una acción indirecta mediada por células de la granulosa y que es transmitido hacia el ovocito a través de las uniones comunicantes (Eppig, 1993). La FSH también es requerida para el RVG, al mantener las uniones comunicantes en las células del cúmulo, dicha comunicación es esencial para la estimulación de la maduración, así juntas o separadas la LH y FSH inducen la continuidad de la meiosis (Foxcroft et al., 1993).

El líquido folicular contiene diversas moléculas como proteínas, aminoácidos, enzimas, carbohidratos, glucoproteínas, gonadotropinas, esteroides, prostaglandinas, inmunoglobulinas, minerales y sales (Hafez y Hafez, 2003), que promueven la maduración nuclear y citoplásmica; los factores solubles del fluido folicular pueden mantener un acoplamiento intercelular entre los ovocitos y las células del cúmulo, lo cual es necesario para la maduración citoplásmica y la

estabilización de la distribución de los gránulos corticales; los factores contenidos en el líquido folicular pueden ser estimulados por la progesterona (Foxcroft et al., 1993).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es el péptido mitogénico más activo de las células de la granulosa en el cerdo (Foxcroft et al., 1993) e induce la síntesis de proteínas (Illera et al., 1998), la adición en el medio de cultivo incrementa significativamente la proporción de ovocitos monospermicos (Illera et al., 1998); se ha demostrado que el EGF incrementa el porcentaje de formación de blastocistos *in vitro* en ovinos (Grazul-Bilska et al., 2003), así como la calidad de los blastocistos en porcinos (Lee et al., 2005); cuando es utilizado en bajas concentraciones promueve la proliferación celular y en altas concentraciones induce pérdida de la adhesión, arresto del ciclo celular, apoptosis e inhibición de la proliferación celular (Zhao et al., 2006).

Los ovocitos y los embriones requieren de ciertas concentraciones de gases como O_2 , CO_2 y N_2 , para difundir con facilidad pequeñas moléculas de otros elementos químicos que requieren para su desarrollo, como las proteínas que son las principales moléculas funcionales de la membrana celular y que además participan como enzimas, antígenos y receptores para varias moléculas, y actúan como bombas al forman canales por los que pasan iones y moléculas pequeñas que sirven para transportar moléculas más grandes al interior o exterior de la célula (Murray et al., 2004).

ANEXO 3

Algunos de los crioprotectores y sustancias utilizadas en el proceso de vitrificación se mencionan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. CRIOPROTECTORES Y SUBSTANCIAS UTILIZADAS EN MEDIOS DE VITRIFICACIÓN.

Componente	Peso molecular	Concentraciones en el diluyente
Etilén glicol (EG)	62.07	35%
Dimetilsulfóxido (DMSO)	78.13	17%
Sacarosa	342.3	0.5 M
Trehalosa	378.33	0.4 M
Polivinil pirrolidona (PVP)	40,000	5%
Yema de huevo	-	10%
Suero fetal bovino (SFB)	-	20%



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cryobiology

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

Viability, maturation and embryo development in vitro of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices [☆]

Filiberto Fernández-Reyez ^{a,d}, Yvonne Ducolomb ^b, Salvador Romo ^c, Eduardo Casas ^b, Zayil Salazar ^b, Miguel Betancourt ^{b,*}

^a Departamento de Producción Agrícola y Animal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, 04960 DF, Mexico

^b Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, 09340 DF, Mexico

^c Laboratorio de Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan. CP 54714, Cuautitlán Izcalli, Estado de Mexico, Mexico

^d Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2011

Accepted 9 February 2012

Available online 18 February 2012

Keywords:

Vitrification

Porcine

Ovine

Immature-oocyte

In vitro maturation

Embryo development

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the effects of vitrification on immature porcine and ovine oocytes, collected at a slaughterhouse, by performing vitrification in devices with different volumes. Viability was evaluated both before and after vitrification and maturation. Immediately after warming, the percentage of viable pig oocytes was 81% regardless the type of device, while in the control (after oocyte selection) was 95%. The viability of matured pig oocytes after warming, vitrified in beveled edge open straws (BES) was 6%, in small-open-pulled-straw (SOPS) was 17% and in cryotop was 4%, while the viability of the control group was 86%. The viability and maturation results were similar with all devices. Embryo development (ED) was observed in fresh porcine oocytes with 15% 2–8 cell embryos, 7% morulae and 3% blastocysts, and non-embryo cleavage was observed in warmed oocytes. The viability of sheep oocytes immediately after warming averaged 90% in all devices, while that of the control (after oocyte selection) averaged 95%. The viability of warmed oocytes after maturation was: BES 21%, SOPS 30%, cryotop 21% and control group 86%; while maturation values were 11, 21, 34 and 70%, respectively. After vitrification, the highest ED was achieved with ovine oocytes vitrified in SOPS, with 17% morulae development and it was the only device in which blastocysts developed. A direct relationship was observed between viability and actin filament integrity in both species.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Animal gametes are a potentially valuable resource for preserving gene pools and genetic diversity. Oocyte and embryo cryopreservation can improve domestic animal breeding in genetic selection programs. Many laboratories are currently developing

techniques to mature cryopreserved oocytes from different species and fertilize them in vitro, thereby producing embryos, which can either be cryopreserved or transferred into female surrogates for producing offspring [12,45].

The development of cryopreservation has resulted in achievements such as technology for the storage of mammalian embryos of livestock including cattle, sheep, pigs and other species [16]. Nevertheless, mammalian oocytes remain one of the most difficult cell types to be successfully cryopreserved due to their sensitivity to cooling and freezing [21,19]. Vitrification is a procedure for preserving oocytes and embryos in which there is no formation of ice crystals, which could damage the morphological and functional cell components [49]. Vitrification is less time consuming than freezing, thereby allowing for an increased number of cryopreserved cells without the use of expensive equipment [5].

The vitrification of immature and mature oocytes has been performed in different species with variable results [45,17,14]. However, it is not yet recognized as a well-established procedure because of its limited potential and the lack of information

Abbreviations: BES, beveled edge open straw; BSA, bovine serum albumin; COCs, cumulus cell-oocyte-complexes; DPBS, Dulbecco's phosphate buffered solution; ED, embryo development; EG, ethylene glycol; FCS, fetal calf serum; GV, germinal vesicle; IVF, in vitro fertilization; IVM, in vitro maturation; MII, metaphase II; mTBM, modified Tris-buffered-medium; MTT, thiazolyl blue; NCSU-23, North Carolina State University-23; OPS, open pulled straw; PVA, polyvinyl alcohol; SOPS, small open pulled straw; TCM-199, tissue culture medium 199; TL, tyrode lactate.

[☆] The study entitled: "Viability, maturation and embryo development in vitro of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices", was funded by institutional sources.

* Corresponding author. Fax: +52 55 58044727.

E-mail addresses: freyes@correo.xoc.uam.mx (F. Fernández-Reyez), duc@xanum.uam.mx (Y. Ducolomb), sromo_99@yahoo.com (S. Romo), dino@xanum.uam.mx (E. Casas), zayil.salazar@gmail.com (Z. Salazar), bet@xanum.uam.mx (M. Betancourt).

regarding the essential biological characteristics of oocytes after warming [30,47]. To improve viability, maturation and embryo development (ED), different vitrification protocols with a variety of cryoprotectants have been performed using pig oocytes with varying results [45,37,20]. In addition, very specific procedures such as oocyte delipation before vitrification have led to increased ED [24].

The success of vitrification depends on cell sensitivity. For example, the meiotic stages of oocytes influence on the ability of the cell to survive cryopreservation [40]. It has been demonstrated that metaphase II (MII) oocytes from human [11], bovine [5], porcine [40] and equine [23] display an increased capacity to recover from cryopreservation damage compared to those in the germinal vesicle (GV), which is probably due to differences in the hydraulic conductivity [3].

Several variables intended to increase oocyte and embryo cryopreservation recovery have been investigated, including the use of protectants such as dimethyl sulfoxide, egg yolk, trehalose, sucrose and ethylene glycol [20,26,36,45,47]. The reduction of cryoprotectant volume has been tested with the 0.25 mL straw [28], open pulled straw (OPS 1–1.5 μ L) [5,40], small open pulled straw (SOPS 0.5–1 μ L) [26], cryotop [37,28] and cryoloop (<0.1 μ L) [29]. The findings show that reducing the volume of the liquid phase protects the cells against ice crystal-induced damage.

Although matured oocyte cryopreservation in porcine and ovine has been well developed [40,46], embryo production in vitro techniques using cryopreserved immature oocytes are not still efficient, which is mainly due to oocyte sensitivity to low temperature [40,50]. It is necessary to improve the research on these species for its potential use in humans and its significance in the production of biological products. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of three different devices on immature porcine and ovine oocytes after the vitrification-warming by determining viability, cytoskeleton integrity, maturation, fertilization and embryo development in vitro.

Materials and methods

A general procedure was applied for both species, and only particular variations for each species are indicated. Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All cells were incubated at 38.5 °C with 5% CO₂ in air and humidity at saturation.

Oocyte collection

Ovaries were collected at a local slaughterhouse, transported to the laboratory at 25–30 °C in 0.157 M NaCl solution containing 75 μ g/mL penicillin G potassium salt and 50 μ g/mL streptomycin sulfate. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) were obtained from follicles with a diameter of 3–6 mm using an 18 gauge needle connected to a 10 mL disposable syringe. Follicular contents were pooled into a 50-mL conical tube and allowed to sediment. Supernatant was discarded, and the sediment was washed twice with modified Tyrode solution supplemented with 10 mM sodium lactate, 10 mM HEPES and 0.1% polyvinyl alcohol (TL-HEPES-PVA) at pH 7.3 to 7.4 [51]. For the collection of ovine COCs, TL-HEPES-PVA was supplemented with heparin (PISA, Mexico) 200 IU/mL [4]. COCs with compact cumulus mass and oocytes with uniform cytoplasm were selected and washed three times in 500- μ L drops of medium TCM-199 with Earle's salts and sodium bicarbonate (In Vitro, Mexico) supplemented with 0.1% PVA, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine and 10 ng/mL epidermal growth factor (maturation medium) [43].

Vitrification

COCs were washed in TCM-199 with Earle's salts, 26.2 mM sodium bicarbonate and 25 mM HEPES (In Vitro, Mexico) supplemented with 20% FCS (In vitro, México) at 37 °C. Following the addition of 4% Ethylene glycol (EG), the cells were equilibrated for 15 min. Finally, for vitrification, COCs were exposed for 20 s to the same medium containing 35% EG and 0.4 M trehalose, loaded into the devices, and plunged in liquid nitrogen in less than 1 min. COCs were stored until needed [4]. The vitrification devices were the 0.25 mL modified straw with beveled edge (BES, 1 μ L final volume), small-open-pulled-straws (SOPS) (Minitube, México) (0.5–1.0 μ L) [26] and cryotop (Kitasato Shizuoka Japan) (<0.1 μ L) [29].

Oocyte warming

COCs were warmed by immersing in a solution containing TCM-199, 10% FCS, and 0.3 M trehalose for 3 min. COCs were washed twice in the same solution now containing 0.2 and 0.1 M, trehalose successively, for 3 min each [4,43]. For both species the thawed COCs were transferred to maturation medium [1].

Oocyte maturation

In vitro maturation (IVM) and in vitro fertilization (IVF) were performed as described by Abeydeera et al. [1]. Briefly, COCs were placed in each well of a four-well plate (Nunc, Denmark) containing 500 μ L of maturation medium supplemented with 0.5 μ g/mL LH and 0.5 μ g/mL FSH. The wells were covered with mineral oil (Fisher Scientific, USA) and incubated for 44 h (porcine) [51] or 24 h (ovine) [12,4]. After maturation, oocytes were fixed and stained for further analysis.

In vitro fertilization

After IVM in pig oocytes, cumulus cells were removed with 0.1% hyaluronidase in maturation medium; while ovine oocytes were not denuded. The oocytes of both species were washed twice in 500- μ L drops of maturation medium and washed three times in 500 μ L drops of modified Tris-buffered medium (mTBM) consisting of 13.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂·2H₂O, 20 mM Tris, 11 mM glucose and 5 mM sodium pyruvate, supplemented with 0.4% bovine serum albumin (BSA) fraction V and 2.5 mM caffeine. This medium was used for IVF [1]. Thirty oocytes were placed into each well of a four-well plate in 50 μ L of mTBM (for pig oocytes) and 450 μ L of mTBM (for ovine oocytes), covered with mineral oil, and incubated for 30 min until insemination.

For insemination, frozen semen was used for both species. A 0.25 mL straw of semen was thawed at 37 °C for 30 s; diluted with 3 mL of Dulbecco's PBS (DPBS; Gibco, USA) supplemented with 0.1% BSA fraction V, 75 μ g/mL potassium penicillin G, and 50 μ g/mL streptomycin sulfate at a pH of 7.2 and centrifuged at 1900g for 5 min. The pellet was diluted in 100 μ L of mTBM.

For porcine, 50 μ L of sperm suspension was added to 50 μ L of the medium containing oocytes, to give a final sperm concentration of 5×10^5 cells/mL. The gametes were co-incubated for 7 h [1]. After the co-incubation period, the oocytes were washed three times in 50 μ L drops of North Carolina State University-23 (NCSU-23) development medium supplemented with 0.4% fatty-acid-free BSA to remove sperm [39].

For ovine, 50 μ L of sperm suspension was added to 450 μ L of the medium containing oocytes to give a final sperm concentration of 1×10^6 cells/mL. The gametes were co-incubated for 21 h. Sperm and cumulus cells were removed and oocytes were washed

three times in 50- μ L drops of synthetic oviductal fluid 1, supplemented with 10% FCS [12,27].

Embryo culture

For embryo culture, pig oocytes were transferred to a four-well plate (40 oocytes per well) containing 500 μ L of NCSU-23 medium [1], while sheep oocytes (10 oocytes per well) were incubated in synthetic oviductal fluid 1 medium, for 72 h and transferred to synthetic oviductal fluid 2 medium [27] for 96 h. Embryos were incubated for a total of 168 h.

Evaluation of cell viability

To evaluate viability, oocytes were transferred to 200 μ L of 0.5 mg/mL MTT (Thiazolyl blue) diluted in TBM. After two hours, 10 oocytes per slide were analyzed under a light microscope (Zeiss AxioStar). Cells showing a purple color were considered viable, while colorless ones were considered non-viable [35].

Evaluation of maturation

To assess maturation and fertilization, oocytes were treated with 10 μ g/mL bisbenzimidazole (Hoechst 33342) for 40 min, washed and incubated for 20 min in 0.075% sodium citrate. Finally, the oocytes were fixed overnight with 2% paraformaldehyde and mounted in PBS-glycerol (1:9). Maturation was analyzed using an epifluorescence microscope (Zeiss AxioStar) at 400 magnification, with excitation filter 350 nm oocytes having a GV were considered immature, those in the first metaphase were considered to be maturing and those in MII with a polar body were classified as matured [13].

Evaluation of embryo development

Embryo cleavage and morulae development were evaluated using an inverted microscope (Olympus Optical) after 168 h post-gamete co-incubation. Embryos with 2–8 blastomeres were considered early embryos, those with higher numbers of blastomeres were classified as morulae, and those with a blastocoele were considered as blastocysts.

Evaluation of cytoskeleton

To assess cytoskeleton integrity (actin microfilaments) after maturation, oocytes were incubated with phalloidin-fluorescein isothiocyanate conjugate (1:1000) for 1 h. Finally, oocytes were mounted in PBS-glycerol (1:9). The presence of actin filaments was assessed using an epifluorescence microscope (Zeiss AxioStar) at 400 magnification, with fluorescein excitation at 490 nm [40].

Statistical analysis

At least, 10 assays were performed and 20 oocytes for assay were evaluated. The data obtained for each indicator (vitrification devices, viability, maturation, embryo development and cytoskeleton integrity) are given as the sum of all assays, therefore the data are absolute numbers, and the percentage corresponds to the total analyzed oocytes. The data were treated as non-parametric and analyzed by the χ^2 test using NCSS 2001 program. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Viability was evaluated before and after vitrification and after IVM. In another sample of warmed oocytes after maturation, the integrity of the actin filaments was assessed. All described parameters were also assessed in the control group (non-vitrified fresh oocytes).

Immediately after warming, the viability of pig oocytes averaged 81% in all devices, while in control was 95%. After maturation, the percentages of the control group viability (86%), IVM (61%) and ED (25%) were higher than the values observed with vitrified oocytes. After vitrification and maturation, oocyte viability in BES (6%), SOPS (17%) and cryotop (4%) groups significantly differed from the control ($p < 0.05$) (Table 1). Maturation after warming was significantly lower in all devices compared to control ($p < 0.05$). Warmed oocytes failed to show any ED.

Immediately after warming, the percentage of viable ovine oocytes was 90% for all devices, with no differences among them. Control oocytes viability, IVM and ED percentages were higher than vitrified oocytes ($p < 0.05$). After vitrification, oocyte viability was similar in all devices: SOPS (30%), cryotop and BES (21%) each. The percentage of oocyte maturation was higher in the cryotop (34%) than with the BES (11%) ($p < 0.05$) (Table 2).

For the fresh control oocytes ED was observed, with 62% of cleavage, 24% of 2–8 cells, 35% of morulae and 3% of blastocysts. After vitrification, the highest ED was achieved in oocytes vitrified in SOPS, with 17% of morulae. The SOPS was the only device in which blastocyst development (3%) was observed (Table 2).

In both species, actin filaments integrity was higher in fresh oocytes than in warmed oocytes ($p < 0.05$). For the porcine oocytes, cryotop and SOPS were the most efficient devices, while for ovine oocytes, all devices showed the same efficiency ($p < 0.05$). (Table 3). Preliminary assays demonstrated a direct correlation between viability and cytoskeleton integrity in control and warmed oocytes (data not shown).

Discussion

For biotechnological application and improvement in the livestock industry, it is necessary to have the ability to store large numbers of oocytes. In the past years, several experiments have been performed to improve vitrification procedures for oocyte cryopreservation. Because freezing equipment is expensive and complex, and this process causes cell damage from ice crystals, vitrification is an alternative, which prevents the formation of harmful crystals and does not require special equipment [4,5,24].

The vitrification of immature oocytes could potentially be used in domestic mammals and humans under different conditions [24,26]. Therefore, the current challenge remains in the ability to achieve ED using immature oocytes recovered from vitrification, as they are more sensitive than matured-warmed oocytes [43,45,50]. Many variables influence the cryopreservation efficiency: cryoprotectants, devices, volumes, vitrification procedure

Table 1
Viability and IVM (44 h) in warmed porcine oocytes.

Treatment	Viability (%)	Maturation (%)
Control	196/227 (86) ^a	160/261 (61) ^a
BES (1 μ L)	4/70 (6) ^b	6/106 (6) ^b
SOPS (0.5–1 μ L)	13/77 (17) ^b	3/88 (3) ^b
Cryotop (<0.1 μ L)	2/46 (4) ^b	4/51 (8) ^b

Viability and IVM analysis were performed in independent assays. Values in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2
Viability, IVM (24 h) and ED (168 h) in warmed ovine oocytes.

Treatment	Viability (%)	Maturation (%)	Embryo development		
			2–8 cells (%)	Morulae (%)	Blastocysts (%)
Control	48/56 (86) ^a	52/74 (70) ^a	63/263 (24) ^a	92/263 (35) ^a	8/263 (3) ^a
BES (1 μ L)	16/75 (21) ^b	8/75 (11) ^b	6/94 (6) ^b	6/94 (6) ^b	0/94 (0) ^b
SOPS (0.5–1 μ L)	10/33 (30) ^b	7/33 (21) ^{b,c}	10/115 (9) ^b	13/115 (17) ^b	4/115 (3) ^a
Cryotop (<0.1 μ L)	11/53 (21) ^b	14/41 (34) ^c	0/32 (0) ^b	1/32 (3) ^b	0/32 (0) ^b

Viability, IVM and ED analysis were performed in different samples.

Values in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3
Actin filaments integrity of fresh warmed ovine and pig oocytes in vitro after maturation.

Treatment	Matured porcine oocytes (44 h)	Matured Ovine oocytes (24 h)
	Fluorescent actin filaments (%) [*]	
Control	148/217 (68) ^a	41/50 (82) ^a
BES (1 μ L)	8/192 (4) ^b	21/88 (24) ^b
SOPS (0.5–1 μ L)	23/148 (16) ^c	12/41 (29) ^b
Cryotop (<0.1 μ L)	24/100 (24) ^c	14/60 (23) ^b

Values in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

^{*} All oocytes showing fluorescent actin filaments were alive.

times and oocyte stages, which must be considered when optimizing the techniques for each species.

There is a variety of cryopreservation strategies and methods that intend to produce porcine offspring from vitrified oocytes in GV or MII stages [8,16]. To minimize the volume of vitrification solutions as much as possible, special devices have been used to improve the vitrification process, avoiding ice crystal formation. In the present study SOPS [26] and cryotop [29] were tested. Besides, a new more economical device was employed (BES).

To date, studies are not conclusive in the determination of whether vitrification yields better results at either the GV or the MII stages. Several authors have shown that the GV oocytes of various species, such as human [11], bovine [5], porcine [40], and equine [23], are more susceptible to the vitrification procedure than those at the MII stage [48], however, cryodamage also occurs in MII oocytes.

Because the benefits of genetic material conservation in porcine and ovine, we vitrified oocytes in GV stage to evaluate viability, maturation, and embryo development after warming, for both species.

In the present study, viability was determined directly by assessing the physiological activity of the mitochondria with MTT stain [13]. Morphological parameters, as faint cytoplasm or damage to zona pellucida [47], are not as accurate as MTT stain, membrane integrity evaluation or IVF success for viability assessment; because these procedures evaluate directly the cell metabolic activity or indirectly the viability itself.

To test that in vitro maturation procedure had no effect in viability, it was evaluated in control porcine oocytes at the time of arrival to the laboratory (90%), and after the maturation period (86%) ($p > 0.05$). The viability rates obtained from vitrified-warmed oocytes after 44 h of maturation were similar to those reported by Huang and Holtz [22]. They reported that 4% of GV oocytes were viable after vitrification, which was measured by fluorescein diacetate, observing that these GV oocytes failed to reach maturation. In the present study, the maturation rate of the GV stage vitrified-warmed oocytes was 3–8%, and IVM in

control oocytes was 61%, which is consistent with the maturation rate of 52–69% described by Abeydeera et al. [2] and the 60% rate observed by Casas et al. [13].

Huang and Holtz [22] tested the effects of different cryoprotectants and vitrification media on the developmental capacity of porcine oocytes at the GV and MII stages; nevertheless, none of these oocytes matured or cleaved after in vitro maturation and fertilization most likely because they died during the process of vitrification. Bali Papp et al. [8] showed that after vitrification, the GV membrane was damaged in most oocytes. Varga et al. [50] demonstrated that follicular cell-surrounded oocytes had a better survival rate than denuded oocytes. However, Somfai et al. [45] by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the GV stage, reported that oocytes reached MII and blastocyst stage. Therefore, the porcine oocytes at different meiotic stages respond otherwise to the cryopreservation process. In this study, GV vitrified-warmed oocytes were able to matured after vitrification procedure.

In the present study, in porcine, ED percentage observed in the control group (25%) was similar to that described by others [15]. However, in vitrified-warmed oocytes despite the rates of viability and maturation observed, there was no ED. This may be explained because pig oocytes and embryos are characterized by a high lipid content, which is stored as droplets in the cytoplasm [38,41]. This high lipid content has a negative influence on successful manipulations of oocytes and embryos, thereby resulting in cryopreservation methods with less success for pig than in bovine [19]. This is supported on the low rates of ED reported by Nagashima et al. [36] and Wu et al. [52] or blastocyst formation reported by Somfai et al. [45].

To improve vitrification methods, different chemicals have been explored such as taxol [43] and cytochalasin B [17] in order to provide cytoskeleton stability and to reduce damage to the meiotic spindle [54]. As the physical changes in lipids at various freezing temperatures are among the major causes of cellular cryodamage, delipation has been used in porcine oocytes at the GV stage to maintain viability and resume meiosis [36,33]. Although a combination of methodologies have been developed to improve vitrified oocyte competence, the results are still controversial [25].

Low success in ED has been achieved using immature or matured oocytes after cryopreservation, mostly due to the damage produced in the cell structures. Despite the improvements in survival and development rates, no piglet has ever developed from cryopreserved porcine oocytes [45].

For ovine oocytes, the viability immediately after warming was 90%, similar to that found by Bogliolo et al. [10], who examined the meiotic competence in vitrified oocytes reporting 84.3% of viability after warming. The percentage of maturation in the control group was similar to those reported by Byrd et al. [12] and Kochhar et al. [27]. Cryopreservation of oocytes in this species has been attempted with varying degrees of success. The majority of such studies have been performed on in vitro matured (MII) oocytes [9,46–48,53]. In this species, there are scarce studies using immature oocytes for vitrification and subsequent maturation and ED.

Silvestre et al. [44] evaluated the effect of cytochalasin B before vitrification on the ability of immature sheep oocytes to progress to the MII stage after the vitrification–warming procedure. In comparison with the current study, both control and vitrified–warmed oocyte maturation rates were similar.

In different mammalian species alterations as abnormal microtubule and microfilament polymerization [43], modified plasma membrane bilayer structure [7,18], disorganization of the spindle and aneuploidy [31], chromosomal aberrations [34], altered distribution of cortical granules [32] and cell death [48], are associated with vitrification, diminishing rate of embryo development after warming. When the effect of different vitrification devices is compared, Succu et al. [48] demonstrated that cryopreservation affects the oocyte structure differently, observing 7% of oocytes with a normal spindle in OPS, 17% in cryotop, and 37% in cryoloop.

In both species, the presence of actin filaments correlated with oocyte viability after vitrification in all devices. For porcine oocytes, SOPS and cryotop were more efficient than BES based on the increased rates of actin filament presence. For ovine oocytes, there were no differences between the devices. Similar results are reported by Shi et al. [42]. Vitrified MII porcine oocytes showed altered microtubule localization and mitochondrial organization resulting in impairment of both, fertilization and ED. Porcine oocytes suffer irreversible damage after vitrification, especially in the meiotic spindle configuration [43]. Wu et al. [52] reported that in vitrified porcine oocytes, normal spindle organization decreased at the GV stage and at the MII stage after warming. Immature oocytes do not have an organized meiotic spindle; therefore, vitrification at the GV stage is another alternative for the cryopreservation of follicular oocytes. Another reason to vitrify immature oocytes, is the possibility to obtain increased amounts of oocytes directly from ovaries.

It has been demonstrated when reducing the cryoprotectant volume ($\leq 5 \mu\text{l}$), the rates of viability, maturation, fertilization and ED increase [6]. In the present study, BES were adapted from 0.25 mL straws to settle $1 \mu\text{l}$ drop containing the oocytes. The cryotop has been developed and broadly used with humans [28]; however, it is very expensive for experimental animal oocyte vitrification in comparison with OPS, SOPS and BES. Therefore, according to our results, it is possible to cryopreserve higher amounts of immature oocytes, which can reach maturation and further ED. The results suggest that the reduced volume of cryoprotectants is necessary to preserve oocyte viability [6].

There is no significant progress in producing blastocysts from ovine oocytes. In some cases, no blastocyst development was achieved [48]. When vitrified–warmed ovine MII oocytes were fertilized, blastocyst formation rates were low (1.3–2.6%) [53]. The results described here show that maturation and ED were higher in ovine than in porcine oocytes after vitrification due to interspecific differences that relate susceptibility to cryopreservation process. Porcine oocytes compared with other mammalian species present many differences like their high cytoplasmic lipid level [19,40]. Ovine morulae were obtained in the three devices and, SOPS yielded the highest rate of morulae formation and was the only device in which blastocysts developed.

In conclusion, minimal volume of medium and the rapid placement of the oocytes into the devices (in less than one minute), improve the process of cryopreservation. It is important to assess directly the viability along the process, mainly after warming and maturation, in order to detect which stage has more susceptibility to the vitrifying–warming process. Susceptibility to vitrification differs with each species, although similar vitrification–warming procedure and devices can be useful for porcine and ovine as is shown in the present study. Further studies are needed to improve methods for successful immature oocytes vitrification, thereby

achieving higher rates of viability, maturation, ED and ultimately resulting in live offspring.

Acknowledgments

This project was partially supported by CONACYT (Registration No. 193211 FF) and PROMEP-SEP Project (UAM-I). We thank Marisol Partida-Durán for technical assistance and Los Arcos and El Rojo slaughterhouses, Mexico, for providing ovaries.

References

- [1] L.R. Abeydeera, W. Wang, R.S. Prather, B.N. Day, *Biol. Reprod.* 58 (1998) 1316–1320.
- [2] L.R. Abeydeera, W.H. Wang, T.C. Cantley, A. Rieke, C.N. Murphy, R.S. Prather, B.N. Day, *Theriogenology* 54 (2000) 787–797.
- [3] Y. Agca, J. Liu, J.J. Rutledge, E.S. Crister, J.K. Crister, *Mol. Reprod. Dev.* 55 (2000) 212–219.
- [4] A.M. Al-aghbari, A.R. Menino, *Anim. Reprod. Sci.* 71 (2002) 101–110.
- [5] J.L. Albarracín, R. Morato, D. Izquierdo, T. Mogas, *Mol. Reprod. Dev.* 72 (2005) 239–249.
- [6] A. Arav, S. Yavin, Y. Zeron, D. Natan, I. Dekel, H. Gacitua, *Mol. Cell. Endocrinol.* 187 (2002) 77–81.
- [7] A. Arav, Y. Zeron, S.B. Leslie, E. Behboodi, G.B. Anderson, J.H. Crowe, *Cryobiology* 33 (1996) 589–599.
- [8] A. Bali Papp, T. Somfai, E. Varga, M. Marosán, *Reprod. Fert. Dev.* 17 (2005) 189.
- [9] F. Berlinguer, S. Succu, F. Mossa, M. Madeddu, D. Bebbere, G.G. Leoni, S. Naitana, *Cryobiology* 55 (2007) 27–34.
- [10] L. Bogliolo, F. Ariu, S. Fois, I. Rosati, M.T. Zedda, G. Leoni, S. Succu, S. Pau, S. Ledda, *Theriogenology* 68 (2007) 1138–1149.
- [11] I. Boiso, M. Marti, J. Santalo, M. Ponsa, P.N. Barri, A. Veiga, *Hum. Reprod.* 17 (2002) 1885–1891.
- [12] S.R. Byrd, G. Flores-Foxworth, A.A. Applewhite, M.E. Westhusin, *Theriogenology* 47 (1997) 857–864.
- [13] E. Casas, E. Bonilla, Y. Ducolomb, M. Betancourt, *Toxicol. in Vitro* 24 (2010) 224–230.
- [14] C. Diez, P. Duque, E. Gómez, C.O. Hidalgo, C. Tamargo, A. Rodríguez, L. Fernández, S. de la Varga, A. Fernández, N. Facal, M. Carbajo, *Theriogenology* 64 (2005) 317–333.
- [15] Y. Ducolomb, S. Romo, J.A. Balcázar, L.F. Rodarte, E. Casas, G.C. Fragoso, E.L. Scitutto, M. Betancourt, *Téc. Pec. Méx.* 43 (2005) 425–432.
- [16] R. Esaki, H. Ueda, M. Kurume, K. Hirakawa, R. Tomii, H. Yoshioka, H. Ushijima, M. Kuwayama, H. Nagashima, *Biol. Reprod.* 71 (2004) 432–437.
- [17] T. Fujihira, R. Kishida, Y. Fukui, *Cryobiology* 49 (2004) 286–290.
- [18] E. Fuku, L. Xia, B.R. Downwy, *Cryobiology* 32 (1995) 139–156.
- [19] B. Gajda, *Reprod. Biol.* 9 (2009) 97–112.
- [20] M.A. Gil, C. Cuello, I. Parrilla, J.M. Vazquez, J. Roca, E.A. Martínez, *Reprod. Dom. Anim.* 45 (Suppl. 2) (2010) 40–48.
- [21] M.K. Gupta, S.J. Uhm, H.T. Lee, *Theriogenology* 67 (2007) 238–248.
- [22] W.T. Huang, W. Holtz, *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 15 (2002) 485–493.
- [23] A.E. Hurtt, F. Landin-Alvarenga, G.E. Seidel, E.L. Squires, *Theriogenology* 54 (2000) 119–128.
- [24] V. Isachenko, J.L. Alabart, M. Dattena, F. Nawroth, P. Cappai, E. Isachenko, M.J. Cocero, J. Olivera, A. Roche, C. Accardo, A. Krivokharchenko, J. Folch, *Theriogenology* 59 (2003) 1209–1218.
- [25] V. Isachenko, E. Isachenko, H.W. Michelman, J.L. Alabart, I. Vazquez, N. Bezugly, F. Nawroth, *Anat. Histol. Embryol.* 30 (2001) 333–338.
- [26] V. Isachenko, M. Montag, E. Isachenko, V. Zaeva, I. Krivokharchenko, R. Shafei, H. Van der Ven, *Hum. Reprod.* 20 (2005) 492–496.
- [27] H.P.S. Kochhar, B. Wu, L.H.A. Morris, B.C. Buckrell, J.W. Pollard, P.K. Basrur, W.A. King, *Reprod. Dom. Anim.* 37 (2002) 19–25.
- [28] M. Kuwayama, G. Vajta, O. Kato, S.P. Leibo, *Reprod. Biomed. Online* 11 (2005) 300–308.
- [29] M. Lane, W.B. Scholcraft, D.K. Gardener, *Fertil. Steril.* 72 (1999) 1073–1078.
- [30] S. Ledda, L. Bogliolo, S. Succu, F. Ariu, D. Bebbere, G.G. Leoni, S. Naitana, *Reprod. Fert. Dev.* 19 (2007) 1–11.
- [31] R.H. Liu, Q.Y. Sun, H.Y. Li, L.H. Jiao, W.H. Wang, *Mol. Reprod. Dev.* 65 (2003) 212–218.
- [32] A. Mavrides, D. Morroll, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 118 (2005) 67–70.
- [33] H. Men, Y. Agca, L.K. Riley, J. Critser, *Theriogenology* 66 (2006) 2008–2016.
- [34] H. Men, R.L. Monson, J.J. Parrish, J.J. Rutledge, *Mol. Reprod. Dev.* 64 (2003) 245–250.
- [35] T. Mossman, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [36] H. Nagashima, R.D.A. Cameron, M. Kuwayama, M. Young, L. Beebe, A.W. Blackshaw, M.B. Nottle, *J. Reprod. Dev.* 45 (1999) 167–176.
- [37] H. Nagashima, K. Himura, H. Saito, R. Tomii, S. Ueno, N. Nakayama, H. Matsunari, M. Kurome, *Biol. Reprod.* 76 (2007) 900–905.
- [38] H. Nagashima, N. Kashiwazaki, R.J. Ashman, C.G. Grupen, R.F. Seamark, M.B. Nottle, *Biol. Reprod.* 51 (1994) 618–622.
- [39] R.M. Petters, K.D. Wells, *J. Reprod. Fert.* 48 (1993) 61–73.
- [40] C. Rojas, J.M. Palomo, J.L. Albarracín, T. Mogas, *Cryobiology* 49 (2004) 211–220.

- [41] M. Romek, B. Gadj, E. Krzysztofowicz, Z. Smorag, *Reprod. Dom. Anim.* 44 (2009) 24–32.
- [42] L.Y. Shi, H.F. Jin, J.G. Kim, B. Mohana Kumar, S. Balasubramanian, S.Y. Choe, G.J. Rho, *Anim. Reprod. Sci.* 100 (2007) 128–140.
- [43] W.Q. Shi, S.E. Zhu, D. Zhang, W.H. Wang, G.L. Tang, Y.P. Hou, S.J. Tian, *Reproduction* 131 (2006) 795–804.
- [44] M.A. Silvestre, J. Yaniz, I. Salvador, F. Santolaria, F. Lopez-Gatius, *Anim. Reprod. Sci.* 93 (2006) 176–182.
- [45] T. Somfai, J. Noguchi, H. Kaneko, M. Nakai, M. Ozawa, N. Kashiwazaki, I. Egerszegi, J. Ratky, T. Nagai, K. Kikuchi, *Theriogenology* 73 (2010) 147–156.
- [46] S. Succu, D. Bebbere, L. Bogliolo, F. Ariu, S. Fois, G.G. Leoni, F. Berlinguer, S. Naitana, S. Ledda, *Mol. Reprod. Dev.* 75 (2008) 538–546.
- [47] S. Succu, F. Berlinguer, G.G. Leoni, D. Bebbere, V. Satta, F. Marco-Jimenez, V. Pasciu, S. Naitana, *Theriogenology* 75 (2011) 715–721.
- [48] S. Succu, G.G. Leoni, D. Bebbere, F. Berlinguer, F. Mossa, L. Bogliolo, M. Madeddu, S. Ledda, S. Naitana, *Mol. Reprod. Dev.* 74 (2007) 1337–1344.
- [49] G. Vajta, *Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals*, *Anim. Reprod. Sci.* 60 (2000) 357–364.
- [50] E. Varga, J.C. Gardón, A. Bali Papp, *Acta Veterinaria Hungarica* 54 (2006) 107–116.
- [51] W. Wang, K. Niwa, *Zygote* 31 (1995) 345–350.
- [52] C. Wu, R. Rui, J. Dai, C. Zhang, S. Ju, B. Xie, X. Lu, X. Zheng, *Mol. Reprod. Dev.* 73 (2006) 1454–1462.
- [53] J. Zhang, T.L. Medambale, M. Yang, J. Li, *Anim. Reprod. Sci.* 110 (2009) 46–55.
- [54] G.B. Zhou, N. Li, *Mol. Hum. Reprod.* 15 (2009) 279–285.