

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**



**Casa abierta al tiempo**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**EFFECTO DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO EN LA VIABILIDAD,  
MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO  
DESPUÉS DE LA VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS INMADUROS PORCINOS  
*IN VITRO.***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**PRESENTA**

BIÓL. EXP. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

**DIRECTOR**

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

**ASESORAS**

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ

DRA. ANA ELENA LEMUS BRAVO

México, D.F., Octubre de 2014

---

## COMITÉ TUTORAL

### **DIRECTOR:**

**Dr. José Miguel Betancourt Rule**

Profesor Titular "C"

Investigador Nacional Nivel III, SNI

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

UAM-Iztapalapa

### **ASESORAS:**

**Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez**

Profesor Titular "C"

Investigador Nacional Nivel I, SNI

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

UAM-Iztapalapa

**Dra. Ana Elena Lemus Bravo**

Profesor Titular "C"

Investigador Nacional Nivel III, SNI

Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

UAM-Iztapalapa

---

“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 003797 ”

Número de CVU 510282 y becario otorgado por CONACyT 302760

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "EFECTO DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO EN LA VIABILIDAD, MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO DESPUÉS DE LA VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS INMADUROS PORCINOS *IN VITRO*" que presentó Miriam Fahiel Casillas Avalos el día 30 de Octubre del 2014.



**PRESIDENTE**

Dra. Ana Elena Lemus Bravo  
Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



**SECRETARIO**

Dr. Filiberto Fernández Reyes  
Departamento de Producción Agrícola y Animal  
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco



**VOCAL**

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramirez  
Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



**VOCAL**

Dra. Cristina Cuello Medina  
Hospital Clínico Veterinario, Facultad de Veterinaria,  
Universidad de Murcia, España.

---

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular de la UAM-Iztapalapa y fue apoyado por CONACyT, México. (CVU/No.Becario: 510282/302760).

Al rastro "Los Arcos" Edo. de México por la donación de los ovarios.

Con todos mis sentimientos al Dr. José Miguel Betancourt Rule.

*"Nunca olvidaré aquel primer día". Gracias.*

Con cariño a la Dra. Yvonne Ducolomb Ramírez por su apoyo incondicional, por estar siempre involucrada en el proyecto y por su entusiasmo en el trabajo del laboratorio. Por motivarme y ser un ejemplo para mi. Por ser mi amiga y estar conmigo siempre.

Con admiración a la Dra. Ana Elena Lemus por hacerme enfrentar mis miedos y ayudarme a corregir mis errores. Por enseñarme que el conocimiento se adquiere con esfuerzo y dedicación. Por haber aceptado ser parte de este camino de aprendizaje.

Con agradecimiento a la Dra. Cristina Cuello Medina por permitirme conocer sus investigaciones y recibirme con mucha alegría en su laboratorio. Por el tiempo dedicado y por inspirarme a mejorar en el área de investigación.

Con agradecimiento al Dr. Filiberto Fernández Reyes por su apoyo técnico e incondicional.

Al Dr. Eduardo Casas Hernández por siempre estar dispuesto a ayudarme incondicionalmente.

Al Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura por su disposición y apoyo a lo largo de la maestría.

Al Biól. Exp Mario Teteltitla Silvestre por todas sus enseñanzas.

A las Biol. Exp. Itzel Plancarte Hernández y Alma López López por enseñarme que de nada sirve saber si el conocimiento no se comparte.

A todos los miembros del laboratorio de Biología Celular S-252.

---

## DEDICATORIA

A la adorada memoria de mi Mamá. Gracias por todo tu amor. Por todas las bendiciones que desde el cielo me envías. Por ser mi fuerza. Por ser la persona mas importante en mi vida. Por ser todo para mi. Porque siempre en cada paso que doy hay una dedicatoria para ti.

A mi Papá que con su esfuerzo de cada día me ha hecho valorar las oportunidades que tengo a mi alcance. Por impulsarme a ser un buen ser humano. Por ser mi ejemplo de perseverancia, dedicación, entrega y trabajo. Por ser uno de mis motivos para seguir adelante.

A mi abuelita Manuela por haberme recibido en su casa. Por educarme y hacerme sentir que no estoy sola. Por su amor y sus atenciones. Por motivarme a ser mejor cada día. La quiero.

A mis abuelos Celia, Enrique y Clemente con todo mi cariño y respeto.

Al amor de mi vida. Por ser el primero y el único. Por ser mi siempre. Descubrí el amor contigo. Te amaré eternamente. Infinitamente. En esta y todas las vidas siempre serás tu.

A mis hermanos Itzi, Yun y Leo por todos los momentos que hemos compartido. Por todo su cariño.

A mis pequeños hermanos Clemente e Isabel que cuando llegaron a mi vida trajeron luz y amor. Por ser el mejor regalo que Dios me ha dado.

A mi hermana Verónica por ser todo para mi. Por ser mi cómplice, mi sostén, mi alegría. Por ayudarme a levantarme. Por impulsarme y por estar en mi vida.

A mi sobrino Daniel y a mi ahijada Karime por enseñarme en sus miradas y sonrisas que el amor es infinito y ser mi motivación.

A mis tías Tere y Anita por ser mi compañía, por ser mis consejeras y por enseñarme que una persona solo necesita amor y humildad para lograrlo todo.

A todos mis tíos y primos por siempre estar conmigo y llenarme de cariño.

A todos los miembros de mi familia.

A mis amigos Daniel y Úrsula por todo su cariño y por compartir este camino.

A mis niños del centro médico ISSEMYM, por esa fuerza y esperanza. Porque de nada sirve tener si no se comparte con otros. Por enseñarme que dar amor y alegría se convierte en recibirlo un millón de veces más. Por ser un ejemplo de vida. Por ser la razón por la que no quiero dejar de superarme.

---

*“Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la  
posesión del conocimiento o de verdades  
irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e  
incesante de la verdad”.*

**Karl Popper.**

---

## RESUMEN

En 1985 se logró el primer estudio de criopreservación sin la formación de cristales de hielo a través de la vitrificación de células de mamíferos. Hasta ahora, muchos estudios se han realizado para aumentar la tasa de supervivencia de los ovocitos y embriones con la finalidad de obtener crías vivas. La vitrificación de ovocitos inmaduros sigue siendo una gran área de investigación debido a que uno de los mayores retos para los criobiólogos de la reproducción es establecer un procedimiento de vitrificación-calentamiento, que permita la creación de bancos de ovocitos y mejoras en las técnicas de reproducción asistida.

La vitrificación se utiliza para criopreservar células, tejidos, órganos e incluso organismos. Esta técnica requiere del uso de agentes crioprotectores (CPAs) añadidos a una alta concentración y recipientes con altas velocidades de enfriamiento-calentamiento para minimizar la formación de cristales de hielo y daño celular. Sin embargo, su uso debe ser el más adecuado debido a su alta toxicidad. Existen pocos trabajos que reportan las tasas de viabilidad, maduración, fertilización de los ovocitos inmaduros después del calentamiento. La mayoría de los trabajos se han realizado en ovocitos maduros y embriones obtenidos *in vivo* en lugar de *in vitro*. Hasta el momento, no hay reportes donde utilicen el recipiente cryolock durante el proceso de vitrificación, y sólo un estudio ha reportado el nacimiento de crías vivas a partir de ovocitos inmaduros porcinos vitrificados con el método de vitrificación en superficie sólida (SSV). Por lo que, este estudio fue diseñado para evaluar la eficiencia de un procedimiento de vitrificación-calentamiento utilizando el recipiente cryolock así como el efecto del co-cultivo de

---

---

ovocitos inmaduros vitrificados con células de la granulosa frescas para incrementar las tasas de maduración *in vitro* (MIV) y desarrollo embrionario (DE) mediante las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En conclusión, mantener la viabilidad de las células de la granulosa es esencial para mejorar las tasas de maduración y fertilización de los ovocitos inmaduros vitrificados.

## **ABSTRACT**

In 1985, the first study achieving ice-free cryopreservation by vitrification of mammalian cells was performed. Up to now, many studies have been carrying out to increase the oocytes and embryos survival rate in order to obtain live offspring. Immature oocytes vitrification continues to be a wide area of research because one of the greatest challenges to reproductive cryobiologists is to establish a vitrification-warming procedure that allows the banking of oocytes and the improvement of assisted reproductive technologies.

Vitrification is used to cryopreserve cells, tissues, organs and even organisms. This technique requires the use of cryoprotectant agents (CPAs) added at a high concentration, and devices with high cooling–warming rates to minimize ice crystal formation and subsequently cell damage; but its use should be the most suitable because they are highly toxic. There are few reports testing immature oocyte viability, maturation and fertilization rates after warming. Most studies are conducted to matured oocytes and embryos obtained *in vivo* rather than *in vitro*. So far, there are no reports testing the cryolock device, and only one study has reported the birth of live offspring from vitrified porcine immature oocytes with the solid surface vitrification (SSV) method. Therefore, this study was designed to evaluate the efficiency of a vitrification–warming procedure using the

---

cryolock device as well as the effect of the co-culture of vitrified immature oocytes with fresh granulosa cells to improve *in vitro* maturation (IVM) and embryo development (ED) by *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) techniques. In conclusion, maintaining the viability of granulosa cells is essential to improve maturation and fertilization rates in vitrified immature oocytes.

---

# ÍNDICE

## CONTENIDO

### PÁGINAS

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
1.1 Crioprotectores .....	14
1.1.1 Osmolaridad .....	16
1.1.2 Transporte a través de las membranas plasmáticas .....	16
1.1.3 Ley de difusión de Fick .....	17
1.1.4 Parámetros biofísicos celulares .....	18
1.1.5 Métodos de criopreservación .....	18
1.1.6 Sistemas de envase, soportes y recipientes .....	20
1.1.7 Reproducción asistida .....	22
1.1.8 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) .....	23
1.1.9 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) .....	24
1.1.10 Características de la técnica de ICSI vs FIV .....	27
1.2 Ovogénesis .....	27
1.2.1 Maduración de los ovocitos .....	28
1.2.2 Detención meiótica .....	29
1.2.3 Mecanismo de la detención meiótica .....	30
1.2.4 Mecanismo de la reanudación meiótica .....	31
1.3 Las células foliculares y su papel durante la gametogénesis .....	32
1.3.1 Función hormonal de las células foliculares .....	34
1.3.2 Células del cúmulo y fertilización .....	36
1.3.3 Co-cultivo con células del cúmulo .....	36
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>38</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>V. HIPÓTESIS .....</b>	<b>44</b>
<b>VI. OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
6.1 Objetivo general .....	44
6.2 Objetivos particulares .....	45
<b>VII. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>45</b>
<b>VIII. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
8.1 Maduración <i>in vitro</i> (MIV) .....	47
8.2 Vitricación .....	48
8.3 Calentamiento y MIV .....	48
8.4 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) .....	49
8.5 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) .....	51
<b>IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>53</b>
<b>X. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>XI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>XII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>XIII. REFERENCIAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>91</b>
<b>ARTÍCULO .....</b>	<b>93</b>

---

## I. INTRODUCCIÓN

La criobiología, término proveniente de las palabras griegas "crio"=frío, "bio"=vida, "logos"=ciencia, es la ciencia encargada de estudiar los efectos de las bajas temperaturas en las células y tejidos con la finalidad de lograr su criopreservación.

Los procesos de criopreservación permiten mantener células, tejidos órganos e incluso organismos a bajas temperaturas generalmente entre los  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$ , manteniendo su metabolismo totalmente inactivado. Las reacciones bioquímicas quedan detenidas permitiendo preservar durante largos periodos su potencial de desarrollo y su viabilidad. En la actualidad la criopreservación ha sido empleada para la conservación de gametos, de manera que tanto la criobiología como las técnicas de reproducción asistida (TRA) han avanzado de forma paralela a lo largo de los últimos 50 años. La criopreservación de gametos de mamíferos se originó en 1949 mediante un trabajo en donde se demostró que los espermatozoides de humano poseen la habilidad de recuperar su viabilidad aún después de haberse mantenido a temperaturas extremadamente bajas (Polge *et al*, 1949). Esto impulsó una revolución en el campo de la inseminación artificial por su aplicación en mamíferos, especialmente en la especie humana.

Hasta hace algunos años, el método empleado para la criopreservación de gametos implicaba un procedimiento de larga duración conocido como método de congelación lenta o convencional. Sin embargo, actualmente la criopreservación ultra-rápida está adquiriendo un gran protagonismo después de haberse demostrado que se han logrado obtener resultados similares o incluso superiores en comparación con la congelación

---

---

lenta. La técnica de criopreservación ultra-rápida es conocida como vitrificación. La vitrificación es un proceso termodinámico que cambia un estado líquido a un estado sólido vítreo excluyendo la formación de cristales de hielo. Esta técnica se desarrolló en 1985 mediante un estudio en donde se realizó con éxito la vitrificación de embriones de ratón (Rall y Fahy, 1985).

La principal característica de esta técnica es la criopreservación en un estado libre de cristales de hielo aplicando tasas de enfriamiento elevadas mediante un recipiente adecuado, utilizando soluciones con altas concentraciones de crioprotectores en un bajo volumen.

La vitrificación no es una técnica reciente, fue descrita por primera vez en 1934 aunque no tuvo éxito hasta años más tarde, debido a que se desconocían los efectos de las altas concentraciones de crioprotectores empleados y la toxicidad que presentaban. Posteriormente en 1985, Rall y Fahy reemprendieron la aplicación de la criopreservación ultra-rápida reduciendo la toxicidad de los medios y disminuyendo el tiempo de exposición, para mejorar sus resultados (Bajo, 2009). De esta manera, las bases de la criopreservación se han ido ampliando con la finalidad de optimizar las condiciones para el desarrollo de este proceso. La formación de hielo intracelular y extracelular, la toxicidad del empleo de crioprotectores y los cambios osmóticos durante el procedimiento son aspectos importantes que deben ser considerados para la obtención de altas tasas de recuperación (Rojas *et al*, 2004).

---

## 1.1 Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias empleadas para la protección contra el daño celular que se produce durante los procesos de congelación, vitrificación y desvitrificación debidos principalmente a la formación de cristales de hielo y a una deshidratación inadecuada. Los crioprotectores alteran las propiedades físico-químicas de las soluciones. Son moléculas hidrosolubles y de baja toxicidad, que actúan disminuyendo la máxima temperatura a la que puede producirse la mayor cristalización del solvente y del soluto. Además disminuyen la temperatura a la que se produce la transición del agua de un estado líquido a sólido, interactuando con las moléculas de agua reduciendo su capacidad de formar enlaces entre ellas. También actúan estableciendo puentes de hidrógeno con otras moléculas biológicas evitando que pierdan su estructura original y por lo tanto, la viabilidad celular (Bajo, 2009).

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

Los crioprotectores intracelulares son de bajo peso molecular lo cual les permite una alta capacidad de difusión. Los comúnmente empleados en la criopreservación de gametos son el dimetilsulfóxido (DMSO), los glicoles como el etilenglicol (EG) y alcoholes como el propanodiol (PROH) y el glicerol. Estos actúan principalmente por los siguientes mecanismos: disminuyen el punto de congelación e interactúan con la membrana

---

---

manteniendo su estructura y previenen el incremento de altas concentraciones de electrolitos, ya que son capaces de unirse a éstos (Arav *et al*, 2002). También permiten el flujo osmótico del agua intracelular a la porción extracelular, generando su deshidratación. Los crioprotectores se distribuyen en la zona citoplasmática celular en el espacio que era ocupado por las moléculas del agua. El uso de altas concentraciones de crioprotectores a un bajo volumen y el establecimiento de combinaciones entre éstos es indispensable para la optimización de los procesos de criopreservación, especialmente en la vitrificación.

Los crioprotectores extracelulares son compuestos de alto peso molecular que normalmente se utilizan asociados a los crioprotectores intracelulares. Ejercen su efecto promoviendo una rápida deshidratación celular aumentando el gradiente osmótico y ayudando a la incorporación, por parte de las células, del crioprotector permeable durante el proceso de vitrificación. Los más utilizados son azúcares como la sacarosa y trehalosa, aunque también se han empleado otras macromoléculas como la polivinilpirrolidona (PVP), el ficol y proteínas de alto peso molecular (Bajo, 2009). Aunque estos crioprotectores son empleados durante la primera etapa de la vitrificación, su principal efecto ocurre durante el proceso de desvitrificación, también llamado calentamiento. Actúan ejerciendo una elevada presión osmótica que genera la salida de los crioprotectores intracelulares y la reincorporación del agua para regresar a la célula a su estado original.

---

### **1.1.2 Osmolaridad**

La cristalización del agua provoca el aumento de la osmolaridad del medio que permanece en estado líquido, variando también el pH de la muestra. Para mantener el equilibrio osmótico, las células deben someterse a un proceso de deshidratación sin sobrepasar el volumen celular crítico, para evitar el colapso celular (Portillo *et al*, 2006). El uso de los crioprotectores permite que el flujo osmótico no sea alterado y que las condiciones celulares sean las adecuadas durante los procedimientos de criopreservación.

### **1.1.3 Transporte a través de las membranas plasmáticas**

La membrana plasmática celular está compuesta básicamente por lípidos, proteínas y en menor proporción de carbohidratos. Esta composición puede variar de acuerdo al tipo y especie celular. El colesterol y los ácidos grasos son los componentes más abundantes en la membrana plasmática. Estos determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante la criopreservación. El transporte de moléculas a través de la membrana son un punto crítico para la supervivencia celular durante el proceso de calentamiento.

La membrana celular es la estructura que sufre el mayor daño durante los procesos de criopreservación. El daño incluye: pérdida de fluidez de los componentes lipídicos, alto grado de fragilidad, ruptura, endurecimiento y pérdida de lípidos. Esta última es importante durante el proceso de calentamiento y rehidratación ya que puede generar una pérdida en la expansión celular para volver a las condiciones isotónicas.

---

---

Durante los procedimientos de criopreservación se requiere el uso de crioprotectores cuya difusión es indispensable para evitar el daño celular. La difusión es el proceso por el cual las moléculas de una sustancia se distribuyen de forma homogénea en un espacio libre. Las bajas temperaturas usadas en la criopreservación generan un aumento en la rigidez de la membrana y la rapidez con la que los cambios osmóticos deben realizarse durante los procesos de vitrificación y calentamiento, hacen que difícilmente los procesos de transporte activo dependientes de ATP se lleven a cabo. Un descenso de temperatura de 25°C a 10°C reduce hasta un 60% la actividad de las bombas de ATP. De esta manera, los procesos de difusión simple predominan en situaciones de estrés osmótico. Las muestras criopreservadas se almacenan a temperaturas de -133°C (vapor de nitrógeno) y -196°C (nitrógeno líquido). A estas temperaturas las actividades biológicas quedan detenidas y no existen fenómenos de difusión ni energía térmica (Ávila-Portillo *et al*, 2006).

#### **1.1.4 Ley de difusión de Fick**

La magnitud de difusión cuando está presente una membrana entre una zona y otra está definida por la ley de difusión de Fick. Esta ley relaciona el gradiente que existe entre ambas zonas; gradiente químico o de concentración y las características de la membrana; grosor, área y permeabilidad del soluto, la cuál es directamente proporcional a la superficie, es decir, al área de la membrana y a la diferencia de concentración del soluto en ambas zonas. La velocidad de difusión es otro parámetro que está determinado por las propiedades del soluto y de la membrana (Ávila-Portillo *et al*, 2006).

---

### 1.1.5 Parámetros biofísicos celulares

Las células tienen la capacidad de variar su volumen en respuesta a cambios osmóticos extracelulares.

Los parámetros biofísicos más estudiados son: 1) el volumen osmóticamente inactivo, que se define como el agua que permanece en la célula en respuesta a un aumento en la concentración de solutos, 2) la permeabilidad de la membrana celular al agua, crioprotectores y solutos y 3) la relación entre el área de superficie celular que difiere entre tipos de células y especies. Estos parámetros son importantes para la generación de protocolos óptimos de criopreservación debido a que si se conoce el tipo celular y su perfil biofísico, es posible determinar las concentraciones adecuadas de crioprotectores para evitar su citotoxicidad.

### 1.1.6 Métodos de criopreservación

Para el desarrollo de la criopreservación, se han empleado diferentes procedimientos en relación a los tipos celulares cuyo objetivo ha sido preservarlos. Estos procedimientos son:

**Congelación lenta o convencional.** En esta técnica, las células son expuestas antes de su enfriamiento a una solución crioprotectora con una concentración de 1-2 M, la cual es considerada hiperosmótica (>300 mOsm). Las células responden al cambio osmótico

---

---

deshidratándose a la vez que incorporan lentamente al crioprotector. Para la supervivencia celular es extremadamente importante determinar la tasa de enfriamiento adecuada que permita una correcta deshidratación celular sin que haya formación de hielo intracelular, la cual está determinada por el tipo celular y por la naturaleza de los crioprotectores utilizados. Por ejemplo, se sabe que para la congelación de embriones humanos mediante esta técnica, la tasa de enfriamiento es de  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $-7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , temperatura a la que se realiza el "seeding" que es la inducción de la formación de hielo en la solución donde se encuentran las células. Con ello se provoca el aumento de la concentración de solutos en la parte líquida facilitando la deshidratación celular y evitando de este modo la formación de hielo en su interior. Sin embargo, se sabe que para la vitrificación de ovocitos, esta técnica no es capaz de evitar la formación de cristales de hielo tanto intra como extracelulares (Bajo, 2009). Esta técnica se realiza sometiendo a las células a bajas temperaturas de forma gradual con equipo especializado. Estas temperaturas incluyen rangos desde  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta  $-196^{\circ}\text{C}$ .

**Criopreservación ultra-rápida o vitrificación.** Se define como la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado sólido vítreo sin la formación de cristales de hielo debido al rápido descenso de la temperatura. Para lograr el estado vítreo, la viscosidad de la muestra aumenta hasta que las moléculas quedan inmóviles. Este aumento de viscosidad requiere velocidades de enfriamiento rápidas y concentraciones elevadas de crioprotectores. La principal estrategia de la vitrificación es pasar el rango de temperatura crítica ( $-30^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) lo más rápido posible para

---

disminuir el riesgo de daño y llevar a la célula hasta la temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  de manera inmediata (Vajta, 2000).

El fundamento de los procedimientos actuales de vitrificación implica la exposición de la célula a un volumen reducido de crioprotectores a elevadas concentraciones, seguido de su introducción rápida a nitrógeno líquido a una temperatura de aproximadamente  $-196^{\circ}\text{C}$  (Vajta, 2000). A diferencia de la congelación lenta, la vitrificación induce un alto grado de deshidratación celular, previo al enfriamiento, mediante la exposición a soluciones con altas concentraciones de crioprotector (4-8 M). La principal desventaja es el efecto citotóxico que pueden producir los crioprotectores si no se realiza correctamente la exposición a los mismos. Es posible limitar la toxicidad de los medios de vitrificación utilizando la combinación de dos crioprotectores intracelulares. De este modo se consigue aumentar su permeabilidad a las células permitiendo su recuperación a temperaturas inferiores y disminuyendo la toxicidad (Bajo, 2009).

### **1.1.7 Sistemas de envase, soportes y recipientes**

Los gametos son colocados y almacenados en una serie de recipientes o soportes diseñados especialmente para mantener la temperatura óptima de preservación. Estos sistemas involucran:

**Contenedores de nitrógeno líquido.** El almacenamiento de las muestras a temperaturas inferiores a  $-120^{\circ}\text{C}$  garantiza la ausencia de reacciones químicas. La única reacción que

---

---

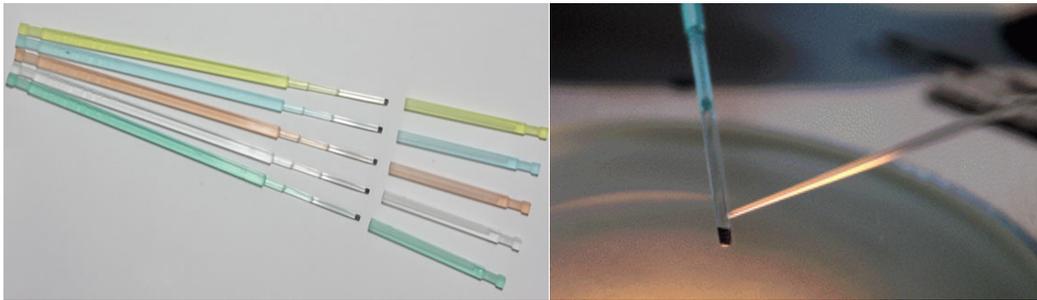
podría producirse es la lenta acumulación de radiaciones ionizantes, pero ésta solo es significativa tras el almacenamiento durante cientos de años, que está involucrada con la disminución de la viabilidad. Los contenedores deben asegurar el mantenimiento de las muestras a la temperatura adecuada y están fabricados con una doble camisa aislante con un espacio que protege su interior (Bajo, 2009). Es importante que para el almacenamiento, las muestras destinadas a un contenedor sean de un mismo tipo celular exclusivamente por ejemplo de gametos. De esta manera la contaminación por muestras estaría controlada.

**Nitrógeno líquido.** Es un producto potencialmente peligroso debido a sus características químicas: es extremadamente frío, a presión atmosférica hierve a  $-196^{\circ}\text{C}$  y produce grandes cantidades de vapores de nitrógeno provocando una disminución de oxígeno en el ambiente. Sin embargo, es esencial para el procedimiento de vitrificación. Mediante técnicas de filtración se han logrado realizar procesos de esterilización del nitrógeno. Sin embargo, su comercialización únicamente se ha empleado en laboratorios de reproducción asistida en humanos.

**Recipientes.** En la búsqueda de optimizar los procesos de criopreservación se han efectuado procedimientos con diversas velocidades de congelación o vitrificación y volúmenes de solución mínimos  $<2\mu\text{L}$  mediante diversos recipientes como: "Super Open Pulled Straws" (Vajta, 2000), microgotas, superficies sólidas (Somfai *et al*, 2008), "Cryoloop", "Cryotop", "Cryolock", entre otros, y la combinación de diferentes crioprotectores, o el uso de crioprotectores por etapas, para disminuir el choque osmótico

---

y la toxicidad (Albarracín *et al*, 2005). El recipiente "Cryolock" a diferencia de otros, maneja un volumen de solución mínimo  $<0.1 \mu\text{L}$ , el cual beneficia el proceso de vitrificación (Figura 1). Actualmente es utilizado como una herramienta en TRA y biotecnología animal, el cual ha sido diseñado y desarrollado con el fin de facilitar el manejo de las técnicas existentes. Su uso ha sido especialmente para la conservación de ovocitos y embriones cuyas características permiten un mantenimiento adecuado y seguro, ya que cuenta con una tapa que protege a la muestra de la contaminación por contacto con nitrógeno líquido durante su almacenamiento (Casillas *et al*, 2014).



**Figura 1. Recipiente Cryolock.**

### **1.1.8 Reproducción asistida**

Las TRA actualmente permiten que las parejas puedan solucionar sus problemas de fertilidad, cuando la concepción no ha sido posible por métodos naturales. La reproducción asistida permite, en ese sentido, recuperar la capacidad reproductiva cuando ésta han sido afectada por algún tipo de patología (Bonilla, 2009).

---

### 1.1.9 Fertilización *in vitro* (FIV)

Entre las TRA que en la actualidad han adquirido una mayor importancia por su constante práctica tanto en producción animal como en la reproducción humana se encuentran la fertilización *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

La FIV permite que una muestra de ovocitos y espermatozoides puedan interactuar en condiciones de laboratorio para la producción de embriones que puedan ser transferidos al útero. Cuando la fusión de ambos gametos se genera, se forma un cigoto el cuál puede desarrollar un nuevo organismo. Este procedimiento consta de cuatro etapas principales:

- 1) La mujer o hembra se somete a tratamiento hormonal para la súper-producción de ovocitos mediante estimulación hormonal.
- 2) Mediante la técnica de laparoscopia se obtienen por aspiración los ovocitos próximos a su maduración y se recuperan por vía vaginal.
- 3) Se produce la fecundación de los gametos en el laboratorio y se obtiene el cigoto, el cual comienza a dividirse.
- 4) De 24 a 48 horas post-inseminación, se implanta el embrión en el útero donde se anida y continúa su desarrollo.

La técnica de FIV se ha logrado realizar con altos porcentajes de éxito en diferentes especies de mamíferos. En la especie porcina trabajos de Abeydeera *et al*, (2000)

---

---

presentan porcentajes de fertilización de un 81% pero con un alto porcentaje de polispermia (42%). La polispermia consiste en la penetración de más de un espermatozoide en el ovocito durante la fertilización y se sabe que la especie porcina presenta este evento de manera natural. Este evento está causado por una falla de la reacción cortical, la cual consiste en una modificación de la zona pelúcida para el bloqueo de la polispermia. Los gránulos corticales liberan enzimas hacia las proteínas ZP2 y ZP3 provocando el bloqueo de la entrada de más de un espermatozoide. Estos gránulos se sitúan debajo de la membrana plasmática del ovocito y tienen función secretora. Cuando el espermatozoide se pone en contacto con la membrana del ovocito se produce una liberación de calcio generando un incremento intracelular de calcio que desencadena la fusión de las membranas de los gránulos corticales con la membrana del ovocito liberando el contenido de los gránulos al espacio extracelular.

Otro aspecto importante para la FIV es el tiempo de co-incubación de los gametos ya que se ha establecido que este evento puede llevarse a cabo en un periodo de 6 h (Ducolomb *et al*, 2005) aunque otros trabajos indican que 3 h son suficientes en la especie porcina (Shi *et al*, 2006; Somfai *et al*, 2010).

#### **1.1.10 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI):**

El proceso de ICSI es similar al de la FIV. Su diferencia radica en que la inseminación de los ovocitos se realiza mediante la introducción directa, a través de un

---

---

micromanipulador, de un espermatozoide en cada uno de los ovocitos maduros (Figura 2).

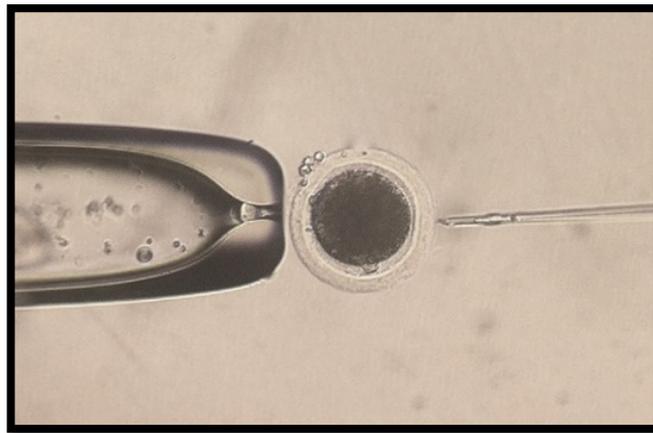
El primer reporte del empleo de esta técnica fue en 1962. En este estudio se registró la inyección de espermatozoides en ovocitos de erizos de mar (Hiramoto, 1962). Posteriormente, un trabajo realizado por Uehara y Yanagimachi en 1976 reportó el primer éxito de ICSI en mamíferos (hámster). Trabajos actuales reportan el nacimiento de crías vivas de diferentes especies mediante ICSI: humano (Palermo *et al*, 1992), ratón (Kimura y Yanagimachi, 1995), cerdo (Kolbe y Holtz, 2000) y hámster (Yamauchi *et al*, 2002). Esto señala la importancia de la técnica en el avance de las TRA.

En los mamíferos el proceso de microinyección se divide en 4 fases.

La primera fase comprende el control y la estimulación de la ovulación. Esto consiste en una hiperestimulación ovárica realizada de forma farmacológica, para lograr obtener un mayor número de ovocitos que en una ovulación normal. Para estimular la ovulación, se administra a la hembra hormona FSH, así como antagonistas de GnRH. Se realizan seguimientos ecográficos transvaginales periódicos para observar el desarrollo folicular en los ovarios. Esto ayuda a programar el momento de recuperación de los ovocitos y medir el grosor del endometrio. Una vez alcanzado el tamaño folicular adecuado, se promueve la maduración mediante la inyección de hormona LH.

La segunda fase comprende la microinyección intracitoplasmática, la cual involucra diferentes procesos:

- 
- Extracción de los ovocitos, la cual consiste en una punción folicular.
  - Obtención y preparación de la muestra de semen, similar a la FIV.
  - Selección del espermatozoide para introducirlo en el citoplasma del ovocito.
- Este proceso requiere de un micromanipulador acoplado a un microscopio y el proceso se repite en cada uno de los ovocitos. Después de 16 h (en la especie porcina) se observa si hay presencia de pronúcleos.



**Figura 2. Inyección intracitoplasmática en un ovocito maduro porcino  
10x.**

La tercera fase comprende el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto si se pretende realizar una transferencia a una hembra receptora y la última o cuarta fase comprende, de requerirse, la criopreservación de los embriones producidos por esta técnica.

---

### 1.1.11 Características de la técnica de ICSI vs FIV

La técnica de ICSI en comparación con la FIV evita los procesos naturales necesarios para la fertilización. Estos procesos son: reacción acrosomal, penetración de la zona pelúcida y fusión con el oolema, reacción cortical y activación del ovocito (Choi *et al*, 2002; Ucar y Parkinson, 2003). Una ventaja de esta técnica en la especie porcina es que se evita la polispermia debido a que se inyecta solo un espermatozoide. La polispermia es un evento importante que se debe eliminar ya que se sabe que en la especie porcina impide el desarrollo de embriones de buena calidad. En contraste, la técnica de FIV no excluye los procesos importantes de fecundación pero si permite la polispermia.

### 1.2 Ovogénesis

La gametogénesis en mamíferos se produce por procesos de división mitótica y meiótica. En el primer proceso de división el número cromosómico es mantenido diploide (2n) pero posteriormente por procesos de división meiótica es reducido a la mitad para producir gametos haploides (n). Las ovogonias son células diploides (2n) que se producen a partir de las células germinales primordiales durante el desarrollo embrionario. Posteriormente, estas células sufren mitosis para convertirse en ovocitos primarios. El inicio de la primera división meiótica, en la mayoría de los mamíferos, queda detenido en el estadio de diploteno de la profase I durante la vida fetal y se reanuda hasta que se alcanza la pubertad. El núcleo del ovocito se conoce como VG. Durante la pubertad, la acción de las gonadotrofinas permite el proceso de reanudación meiótica y la expulsión

---

---

del primer cuerpo polar en la etapa de metafase II. En este momento, se forma un ovocito secundario el cuál ya es haploide (n). Nuevamente la meiosis queda detenida hasta que se generen los procesos de ovulación y fertilización. Si el ovocito es fecundado se finaliza la segunda división meiótica que incluye la expulsión del segundo cuerpo polar y formación de los pronúcleos. Finalmente se obtiene un cigoto, que presenta nuevamente un número cromosómico diploide (2n).

### **1.2.1 Maduración de los ovocitos**

Los ovocitos gradualmente adquieren la maduración nuclear y citoplásmica durante su crecimiento. La competencia meiótica, que es la capacidad de los ovocitos para reanudar la meiosis y convertirse en nuclearmente maduros, es adquirida durante la foliculogénesis y coincide con la formación del antro, donde los ovocitos alcanzan aproximadamente el 80% de su tamaño final. El desarrollo de la competencia del ovocito se relaciona con la maduración citoplásmica del ovocito y se refiere a su capacidad para ser fertilizado y desarrollar un embrión apto para continuar su desarrollo a término y producir un individuo vivo. La maduración citoplásmica se adquiere después de que el ovocito es meióticamente competente. Un ovocito que ha adquirido la competencia meiótica no necesariamente adquiere la maduración citoplásmica.

La maduración meiótica involucra una cascada de procesos, iniciada con una oleada de LH, promoviendo el progreso del ovocito a la metafase II y a la extrusión del primer cuerpo polar. Después de la oleada de LH, un evento que es esencial para la reanudación

---

---

de la meiosis, es la expansión de las células del cúmulo, la cual es causada por la producción de ácido hialurónico procedente de estas células en respuesta a las gonadotropinas (Downs *et al*, 1989).

### **1.2.2 Detención meiótica**

Los ovocitos de mamíferos, a diferencia de los anfibios o equinodermos, tienen una maduración espontánea cuando son liberados de los folículos y cultivados *in vitro*. Por ello, se ha propuesto que las células foliculares que rodean al ovocito, las células del cúmulo, son las responsables de esta detención a través de la producción y liberación de moléculas como AMPc o purinas como adenina e hipoxantina. Las señales de inhibición de las células foliculares pueden transmitirse al ovocito a través del líquido folicular, por las uniones comunicantes como es el caso del ratón y la rata (Betancourt *et al*, 2003). Altos niveles de AMPc, suministrado principalmente por las células foliculares, permiten mantener la detención del ovocito en profase I y sólo es liberado del efecto inhibitorio cuando se interrumpe la comunicación a través de las uniones comunicantes y los niveles de AMPc descienden. Esta disminución va a inactivar a la proteincinasa dependiente de AMPc (PKA) y a través de una cascada de señalización, se activa una fosfatasa que desfosforila al factor promotor de la maduración (FPM) (Betancourt *et al*, 2003).

### 1.2.3 Mecanismo de la detención meiótica

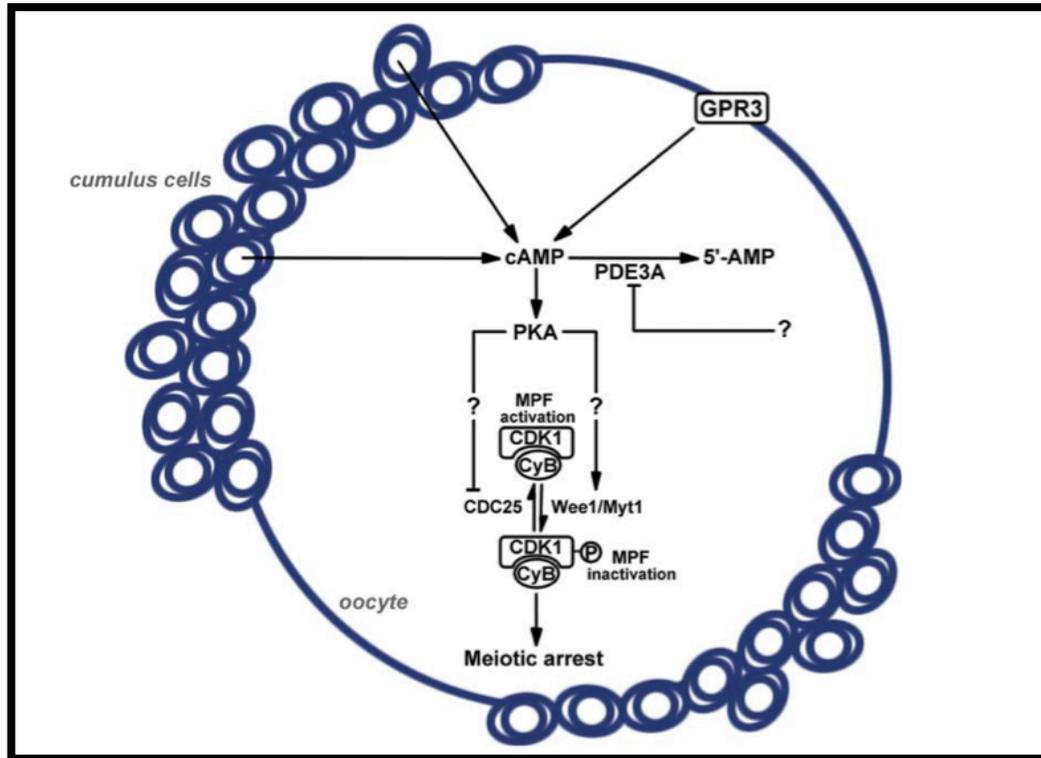


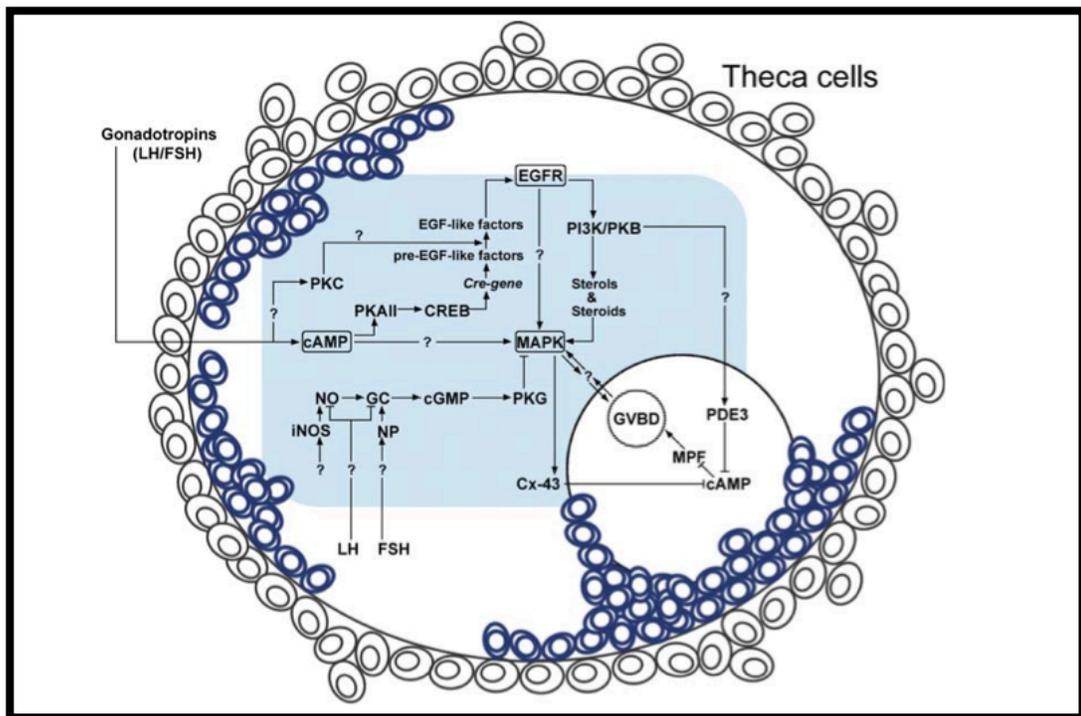
Figura 3. Regulación de la detención meiótica en mamíferos (Zhang *et al*, 2009).

El AMPc producido a través de la estimulación de la proteína-G llamada Gs por el receptor acoplado a proteínas-G 3 (GPR3), es transportado al ovocito por las células del cúmulo y/o capturado por inhibidores de la fosfodiesterasa 3A (PDE3A) en el medio folicular. La proteína-quinasa dependiente de AMPc regula la actividad del FPM por la fosfatasa CDC25, y la quinasa Wee1/Myt1: cDC25 desfosforila la quinasa dependiente de ciclina (CDK1), aunque Wee1/Myt1 la fosforila. Altos niveles de AMPc dan como resultado la fosforilación de CDK1 y el complejo del FPM, CDK1/ciclina B (CyB) se

vuelve inactiva (Figura 3), para que de esta manera el ovocito permanezca detenido en la etapa de VG (Zhang *et al*, 2009).

Otro de los modelos propuestos acerca de la detención de la profase I se debe a la acción de las purinas, donde la adenosina estimula a la adenilato ciclasa a través de un receptor de membrana, mientras que la hipoxantina transferida por las células foliculares a través de las uniones comunicantes impide la hidrólisis del AMPc, al inhibirse la AMPc-fosfodiesterasa. El efecto es que no se genere la reanudación de la meiosis por el mantenimiento de altos niveles de AMPc (Betancourt *et al*, 2003).

#### 1.2.4 Mecanismo de reanudación meiótica



**Figura 4. Modelo propuesto de la reanudación meiótica de ovocitos de mamíferos en folículos pre ovulatorios, inducida por gonadotropinas (Zhang *et al*, 2009).**

---

---

Las gonadotrofinas se unen a sus receptores en las células del cúmulo produciendo un incremento en la producción de AMPc. La proteína cinasa A tipo II (PKAII) es activada por este incremento de AMPc en las células de la granulosa que conlleva a la regulación de CREB en la transcripción del gene-Cre, incluyendo a los precursores transmembranales de factores de crecimiento epidérmico (EGF), los cuales se vuelven péptidos maduros posiblemente por la vía de la proteína-cinasa C (PKC). Los factores de EGF se unen a su receptor EGFR activando la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) empleando fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)/proteína-cinasa B (PKB) y una regulación a la baja de la esteroidogénesis. La activación de MAPK y PI3K/PKB disminuyen el nivel de AMPc en el ovocito por la fosforilación de la conexina 43 (Cx-43) y la activación de la PDE3A, respectivamente, seguido del complejo FPM el cual se activa para la reanudación meiótica (Figura 4). La acumulación de GMPc por óxido nítrico (NO) y/o péptidos natriuréticos por estimulación de FSH sirven para impedir una maduración prematura del ovocito, mientras que la disminución de este segundo mensaje después del tratamiento con LH participa en la maduración y ovulación del ovocito (Zhang *et al*, 2009).

### **1.3 Las células foliculares y su papel durante la gametogénesis**

Los folículos primordiales de los ovarios de mamíferos están constituidos por un ovocito, detenido en la profase de la primera división meiótica, rodeado por una sola capa de células foliculares. Las células foliculares emiten proyecciones citoplásmicas hacia el ovocito estableciendo uniones comunicantes. Al finalizar el periodo de crecimiento

---

---

folicular, el ovocito detiene su crecimiento y permanece rodeado de varias capas de células foliculares, conocidas a partir de ese momento como células del cúmulo o *cumulus oophorus*, formando el complejo ovocito-células del cúmulo (COCs) (Betancourt *et al*, 2003).

La comunicación entre las células germinales y somáticas son necesarias para la supervivencia del ovocito y su desarrollo. A través de las uniones comunicantes se transfieren sustancias nutritivas de bajo peso molecular como el piruvato y precursores metabólicos como aminoácidos y nucleótidos. Estas sustancias permiten concluir con la primera división meiótica y adquirir su capacidad fecundante. Después de que se produce un incremento en los niveles de LH, que induce la ovulación, las señales intercelulares se interrumpen por la producción de ácido hialurónico por parte de las células del cúmulo que ocasiona su dispersión. El ovocito secreta un factor inductor de la expansión de las células del cúmulo (Epigg, 1991).

El FPM fue descrito originalmente en ovocitos de anfibios. Es un complejo proteínico ampliamente conservado desde el punto de vista evolutivo, ya que se ha encontrado en formas similares desde levaduras hasta humanos, tanto en células somáticas como germinales. En los mamíferos se ha encontrado en especies como bovinos y cerdos. El papel fundamental del FPM es desencadenar la transición de las células desde la fase G2 a M en el ciclo celular, pero debido a que los cambios cíclicos en la activación del FPM son cruciales en la regulación del ciclo mitótico en células somáticas, en la maduración

---

de los ovocitos, puede involucrar cambios cíclicos similares en la actividad del FPM (Betancourt *et al*, 2003).

### **1.3.1 Función hormonal de las células foliculares**

Bajo la influencia de las gonadotrofinas, los folículos sintetizan hormonas esteroides tales como andrógenos y estrógenos, las cuales contribuyen al desarrollo folicular, al inducir la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa a través de receptores a andrógenos (RA) y receptores a estrógenos (RE), respectivamente. Las células de la teca producen andrógenos bajo la influencia de un estímulo de la LH, mientras que las células de la granulosa producen estrógenos, utilizando a los andrógenos como sustrato, bajo la influencia de la FSH. Los andrógenos, participan en la proliferación y sobrevivencia de las células de la granulosa a través de los RA. Ratas hembras con una deficiencia en los RA son subfértiles y presentan un reducido número de folículos antrales y ovocitos ovulados, además de una alta tasa de apoptosis en células de la granulosa. De esta manera, los RA específicos para las células de la granulosa son esenciales para el desarrollo folicular y sobrevivencia (Sánchez y Smitz, 2012).

El estradiol, es el estrógeno predominante en términos de la actividad estrogénica. Una de las principales funciones de las células de la granulosa pre-ovulatorias es la síntesis de estradiol. Dentro del folículo, el estradiol es producido mediante la enzima aromatasa, incrementando la respuesta de las células de la granulosa a las gonadotrofinas. El

estradiol presenta un papel esencial en la diferenciación folicular inducida por gonadotropinas (Figura 5).

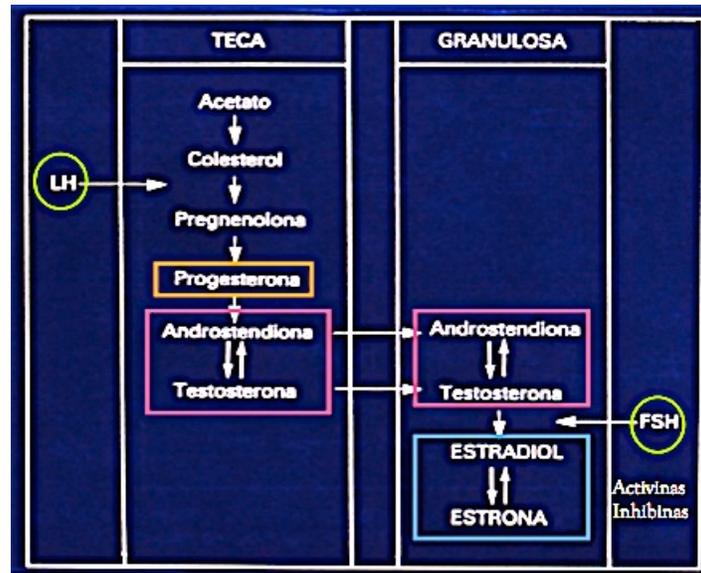


Figura 5. Papel hormonal de las células foliculares.

Las activinas e inhibinas producidas por las células de la granulosa presentan papeles esenciales en funciones paracrinas por regular la síntesis de andrógenos inducida por la LH producida por las células de la teca, y por lo tanto, garantizan el suministro de estradiol. El sistema activina-inhibina no sólo regula la proliferación de las células de la granulosa, sino que también su diferenciación y la maduración de los ovocitos (acelerada por la acción de la activina A) (Sánchez y Smitz, 2012).

---

### **1.3.2 Células del cúmulo y fertilización**

La matriz extracelular de las células del cúmulo está constituida principalmente por ácido hialurónico conjugado con diversas proteínas, confiriéndole al tejido una estructura resistente. Al inicio de la meiosis la matriz es secretada por las células del cúmulo, logrando una expansión de ellas antes de la ovulación. En condiciones *in vitro*, cuando los ovocitos se incuban en presencia de FSH y LH se produce la expansión de las células del cúmulo indicando que el ovocito ha madurado (Betancourt *et al*, 2003).

Los espermatozoides deben estar capacitados para poder penetrar a través de las células del cúmulo. Su acrosoma contiene diversas enzimas como la hialuronidasa y la acrosina, que se adquieren durante la maduración espermática en el epidídimo y que van a ser responsables de que adquiera la capacidad de penetración.

En algunas especies de mamíferos como porcinos y bovinos la presencia de las células del cúmulo hacen más eficiente la FIV debido a que incrementan la movilidad espermática y promueven la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1994).

### **1.3.3 Co-cultivo con células del cúmulo**

Mantener la calidad de los ovocitos es un aspecto crítico e importante para completar los procesos de maduración, fertilización, pre-implantación, desarrollo embrionario e implantación. Estudios indican que remover las células del cúmulo antes de la MIV

---

disminuye la calidad de los ovocitos durante la MIV en especies como ratón y cerdo (Schroeder y Epigg, 1984; Wongsrikeao *et al*, 2005). Sin embargo, remover las células del cúmulo es esencial para algunas técnicas de manipulación como la criopreservación de ovocitos en estado de VG e ICSI (Zhang *et al*, 2010). Es por esto que con el uso de un co-cultivo con células del cúmulo se pretende restablecer el potencial de desarrollo de los ovocitos desnudos debido a que estudios han reportado que éstas células tienen una función importante en el proceso de maduración, regulando el progreso meiótico para la maduración nuclear y citoplasmática. Por ejemplo, la síntesis de glutatión (GSH) en COCs durante la MIV se ha reportado en la especie porcina (Yoshida *et al*, 1993). Estudios indican que las células del cúmulo tienen un papel importante en la síntesis de GSH, el cuál ejerce una protección celular para disminuir el estrés oxidante. Esto resulta importante debido a que los cultivos *in vitro* se mantienen en altas concentraciones de O<sub>2</sub> en comparación con un ambiente *in vivo* (De Matos *et al*, 1996; Luvoni *et al*, 1996). Esto genera un incremento en las especies reactivas de oxígeno que conducen a una disminución de los niveles antioxidantes y muerte celular por apoptosis (Tatemoto *et al*, 2000).

Los efectos benéficos de los co-cultivos son la secreción de factores como nutrientes, substratos, factores de crecimiento y su poder desintoxicante de los medios de cultivo (Cihangir *et al*, 2010). Un estudio utilizando ovocitos de humano señaló que el empleo de un co-cultivo de ovocitos de humano con células del cúmulo autólogas disminuyó su fragmentación e incrementó el número de embriones que alcanzaron los estados de 4-8 células y blastocistos (Quinn y Margalit, 1996). Otro estudio reportó que el uso de una

---

---

monocapa de células del cúmulo no era capaz de incrementar los porcentajes de maduración en la especie porcina. Sin embargo aún se requiere investigar los mecanismos de acción de las células del cúmulo en un co-cultivo que estén implicados en su acción protectora en contra de eventos apoptóticos, su factores de secreción y en el incremento su potencial de desarrollo durante la maduración.

## **II. ANTECEDENTES**

La criopreservación de cigotos y embriones de mamíferos ha sido una parte integral de los métodos de reproducción animal que se ha logrado con mayor éxito (Somfai *et al*, 2008b). Sin embargo, la vitrificación de ovocitos ha tenido poco éxito con bajas tasas de viabilidad, maduración, fertilización y desarrollo embrionario (Rojas *et al*, 2004; Fernández-Reyes *et al*, 2012). Con respecto a la experiencia clínica, en 1986 se reportó el primer embarazo humano después de la criopreservación de un ovocito usando la técnica de congelación con DMSO. Sin embargo, fueron años después cuando se logró primer nacimiento humano, producto de la vitrificación de un ovocito, utilizando EG. En los últimos años ha resurgido significativamente el interés en los beneficios potenciales de los protocolos de vitrificación y de las TRA en humanos. Recientemente, los avances en reproducción asistida y embriología, incluyendo la mejora de los medios de cultivo, fertilización por ICSI y la optimización de crioprotectores, han tenido resultados favorables en la vitrificación de ovocitos (Jain *et al*, 2006).

---

El propilenglicol (PROH) es el crioprotector permeable más usado en la vitrificación de ovocitos, se utiliza en concentraciones de 1.5, 3 y 6 M para evitar la formación de cristales de hielo en la fase de vitrificación y crear un estado sólido vítreo. En contraste el crioprotector impermeable más utilizado y que actúa en la fase de calentamiento es la sacarosa. Estos se deben combinar y usar en altas concentraciones, por lo cual es necesario resguardar a las células en criocontenedores de bajos volúmenes para evitar una mayor citotoxicidad.

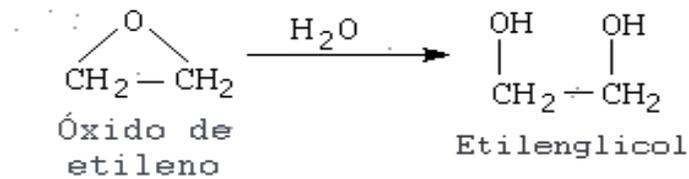
Además de los crioprotectores permeables, los no permeables son frecuentemente incorporados en la solución de vitrificación. Estos pueden promover la vitrificación de una solución, reduciendo la toxicidad de una solución al disminuir la concentración de los agentes permeables. Contribuyen a la regulación de la osmolaridad de la solución, mientras que los mono y disacáridos ejercen un efecto osmótico considerable.

La adición de un azúcar promueve la deshidratación y consecuentemente, la vitrificación intracelular, al reducirse la cantidad de crioprotector intracelular disminuyendo su toxicidad. El grado de deshidratación varía en presencia de concentraciones elevadas de sacarosa. Se ha reportado que la sacarosa presenta beneficios adicionales durante la vitrificación, estabilizando los lípidos de la membrana plasmática. Otros estudios reportan que la tasa de viabilidad de los ovocitos en el calentamiento mejora si la concentración de sacarosa es mayor a 0.1 M lográndose un mayor grado de deshidratación. La sacarosa es el azúcar más comúnmente incorporado

---

en la solución de vitrificación, pero se han empleado trehalosa, glucosa y galactosa (Urbina y Biber, 2008).

El EG se produce a partir del etileno, mediante un compuesto intermedio denominado óxido de etileno, el cual reacciona con el agua produciéndolo (Figura 6).



**Figura 6. Formación del etilenglicol.**

La reacción puede ser catalizada (incrementada) mediante ácidos o bases, o puede ocurrir en un pH neutro a temperaturas elevadas. Su mayor producción se logra con un pH ácido o neutro en presencia de agua en gran proporción, alcanzando una productividad del 90% (Bautista y Kanawa, 1998). Una gran cantidad de soluciones vitrificantes han sido formuladas con el EG en combinación con azúcares y otros agentes crioprotectores. El EG puede ser usado como único crioprotector en una solución sin azúcares, o en combinación con el medio de cultivo sin disminuir sus propiedades de vitrificación.

El DMSO es uno de los crioprotectores permeables más utilizados en las técnicas de vitrificación. Su fórmula molecular es:  $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ , que contiene un grupo sulfóxido. Debido a sus características físico-químicas, el DMSO es capaz de atravesar fácilmente las membranas de la mayoría de las células y tejidos. No obstante, puede ser altamente

---

tóxico. Es por esto que debe reducirse el tiempo de exposición de las células a este compuesto. El DMSO suele emplearse en un rango de concentraciones del 5 al 10%, sin embargo, la concentración varía con cada tipo celular, seleccionando la concentración más alta que la célula pueda tolerar. Entre la normativa de uso, el DMSO debe ser manipulado con el uso de guantes, ya que puede ser absorbido por la piel y ser tóxico (Loyzaaga, 2011).

Actualmente no existe un protocolo de vitrificación exitoso para ovocitos porcinos debido a que éstos presentan características diferentes a otras especies. El porcentaje de lípidos en los ovocitos porcinos es mayor al que presentan los de ovinos, bovinos y humanos, a la presencia de éstos se le han atribuido los bajos porcentajes de éxito (Rojas *et al*, 2004; Jin *et al*, 2012; Liang *et al*, 2012; Prentice *et al*, 2012). Para reducir el porcentaje de lípidos se han realizado trabajos con técnicas de extracción total o parcial denominada deslipidación (Park *et al*, 2005; Li *et al*, 2009) o centrifugación sin extracción de lípidos (Somfai *et al*, 2008). Sin embargo los resultados empleando estas técnicas no han aumentado significativamente los porcentajes de viabilidad, maduración, fertilización y desarrollo embrionario. En años recientes se realizó un trabajo de vitrificación de embriones porcinos en pajillas SOPS, donde no se requería de la centrifugación o extracción lipídica para mejorar los porcentajes de éxito (Cuello *et al*, 2010).

Para la realización de diversos estudios es importante considerar las diferencias que existen entre las características de los ovocitos y embriones. Los ovocitos en etapa de

---

---

VG, son células con una proporción de menor volumen en relación a la superficie, en comparación con los embriones reduciendo la permeabilidad de los crioprotectores. Los embriones cuentan con un mayor número de células lo cual proporciona una ventaja durante su criopreservación. La gran cantidad de lípidos y la presencia de las células del cúmulo que rodean el ovocito, necesarias para la reanudación de la meiosis a través de las uniones comunicantes, hacen que haya una menor permeabilidad celular a los crioprotectores causando daño celular (Jin *et al*, 2012). Sin embargo, algo a su favor es que el material genético está contenido en el núcleo, reduciendo la posibilidad de daño cromosómico y de los microtúbulos del huso meiótico durante la criopreservación en comparación con ovocitos en etapa de metafase II (Prentice y Anzar, 2010).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La criopreservación de ovocitos tiene una gran importancia en diferentes aspectos. En humanos puede ayudar a personas sometidas a tratamientos de enfermedades como el cáncer y a pacientes con problemas de infertilidad, a lograr la gestación a través de las TRA. Actualmente la decisión de postergar la maternidad y la creación de bancos de donación es algo que puede lograrse mediante técnicas de criopreservación como la vitrificación.

En la producción animal, puede contribuir al mejoramiento genético del ganado. En la actualidad en granjas productoras, se ha presentado una disminución en la diversidad genética de la especie porcina debido a que las demandas mercantiles han ocasionado una

---

---

sobreproducción incontrolada. Además, otro aspecto importante de la criopreservación está relacionado con la preservación de diferentes especies en peligro de extinción, en lo que se refiere al porcino, se sabe que algunas especies, sobre todo en países europeos se encuentran en peligro. La organización de alimentos y agricultura de las naciones unidas (FAO) ha manifestado que existe un 20% de pérdidas genéticas en especies de cerdos y caballos que con el uso de la vitrificación podría solucionarse (Prentice y Anzar, 2010). Además la pérdida de la heterocigosidad ocasionaría un grave problema en la adaptación de las especies al medio ambiente por el cambio climático y su resistencia a enfermedades. La importancia de la conservación de genes específicos es una de las metas de la criopreservación. Por ejemplo, el gene Booroola fecundity o FecB en ovejas, incrementa la tasa de ovulación y el número de crías por oveja (Prentice y Anzar, 2010).

Debido a que no existe un protocolo eficiente para la vitrificación de ovocitos en etapa de VG, realizar mejoras a la técnica de vitrificación proporcionaría mayores oportunidades de incrementar la tasa de recuperación de los ovocitos. Sin embargo, los daños causados por la vitrificación, siguen siendo el principal obstáculo para el éxito de la preservación de ovocitos de mamíferos por la alteración de procesos fundamentales como la fertilización, debido a la escasa capacidad de recuperación de los ovocitos después de la criopreservación (Fernández-Reyes *et al*, 2012).

---

## **IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Podrá mejorarse la permeabilidad de los ovocitos a los crioprotectores mediante su separación de las células del cúmulo antes del proceso de vitrificación y por lo tanto, incrementar las tasas de viabilidad, maduración y conservar su capacidad de ser fecundados con el uso de un sistema de co-cultivo?

## **V. HIPÓTESIS**

Dado que la presencia de las células del cúmulo que rodean al ovocito en VG impiden una mayor permeabilidad de los crioprotectores que disminuyen los daños causados por el descenso de la temperatura, entonces, si se realiza la denudación de los ovocitos previamente a la vitrificación y posteriormente se ponen en co-cultivo con células del cúmulo intactas para su maduración, se incrementarán las tasas de viabilidad, maduración fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Vitrificar ovocitos porcinos en etapa de VG en presencia y ausencia de células del cúmulo

---

## 6.2 Objetivos particulares

- Realizar la maduración *in vitro* de ovocitos vitrificados:
  - Ovocitos rodeados por células del cúmulo
  - Ovocitos desnudos con células de la granulosa agregadas al medio de cultivo.
- Realizar las técnicas de FIV e ICSI de los ovocitos vitrificados que llegaron a la etapa de metafase II.
- Evaluar el desarrollo embrionario de los ovocitos vitrificados.

## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los ovocitos en VG fueron obtenidos por punción de folículos ováricos de 3-6 mm de diámetro. Después de su colecta, se dividieron en tres grupos experimentales:

- Grupo control: ovocitos con células del cúmulo (COCs) a los que no se les realizó la técnica de vitrificación y se maduraron después de la colecta. Con una n= 50 ovocitos por cada grupo.
- Grupo T1: COCs intactos vitrificados, calentados y madurados.
- Grupo T2: Ovocitos desnudos de las células de cúmulos (NkO), vitrificados, calentados y posteriormente co-cultivados con células del cúmulo y foliculares para su maduración

Los grupos T1 y T2 se vitrificaron en el recipiente cryolock con 9 ovocitos por cada recipiente, permaneciendo en nitrógeno líquido durante 30 minutos, con una n= 25 ovocitos por grupo (Coticchio *et al*, 2004; Mahmoudi *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2010).

La obtención de las células del cúmulo se realizó mediante la denudación de los ovocitos por separación mecánica. Las células de la granulosa antrales se colectaron del fluido folicular. Se colocaron en una caja petri con medio TCM-199 y se incubaron previo a la MIV durante 1h. Para los grupos control, T1 y T2, después de la MIV, se les realizaron las técnicas de FIV e ICSI. Posteriormente los ovocitos permanecieron en desarrollo embrionario (DE) para evaluar las tasas de MIV, FIV, ICSI y DE (Figura 8).

Después de la exposición por 30 min a nitrógeno líquido de los grupos T1 y T2, se realizó el procedimiento de calentamiento y posteriormente se realizó la MIV. Para el grupo T2, los ovocitos se colocaron en presencia de células del cúmulo y foliculares en el medio de cultivo. Después de la MIV se realizaron las técnicas de FIV, ICSI y DE (Imoedemhe y Sigue, 1992; Tharasanit *et al*, 2009; Jin *et al*, 2012). Se evaluaron las tasas de viabilidad, MIV, FIV, ICSI y DE para todos los grupos mediante las tinciones de MTT y Hoescht. Para el caso del DE la evaluación fue observacional mediante un microscopio invertido.

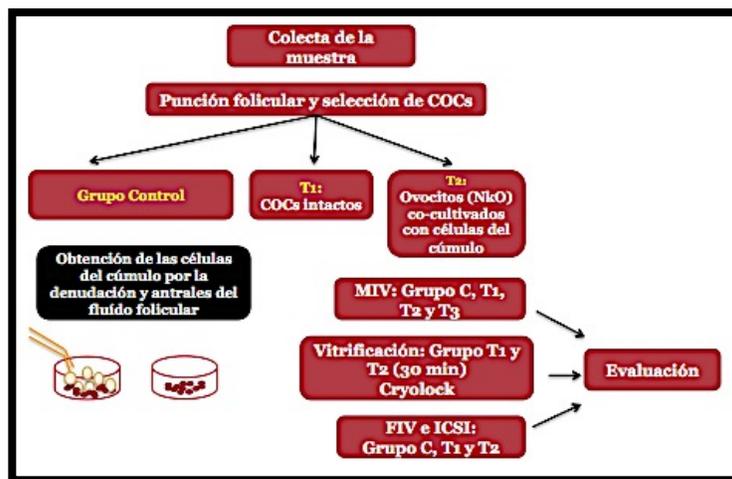


Figura 8. Diseño experimental.

---

## VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1 Maduración *in Vitro* (MIV)

Al menos que se indique lo contrario los reactivos fueron de la marca Sigma Chemical Co. (EUA).

Se obtuvieron ovarios de cerdas prepúberes sacrificadas en el rastro y se transportaron al laboratorio en una solución salina de NaCl al 0.157 M. Los ovarios fueron puncionados para la obtención del fluido folicular, el cual contenía a los ovocitos. La muestra se dejó sedimentar durante 20 min. Al paquete celular obtenido se le realizaron dos lavados cada 15 min con medio de Tyrode modificado suplementado con lactato de sodio 10 mM, HEPES 10 mM y 0.1% de alcohol polivinílico (TL-HEPES-PVA) a un pH de 7.3-7.4. Después de los lavados, la muestra se colocó en una caja Petri para realizar la colecta de los COCs. En cajas Petri se prepararon 3 gotas de lavado de 500  $\mu$ L de maduración TCM-199 (In Vitro, México) suplementado con cisteína y 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF), cubiertas con aceite mineral. Los ovocitos se lavaron en las 3 gotas de para posteriormente ser colocados en una caja de 4 pozos, cada uno de los cuales contenía gotas de 500  $\mu$ L del medio de maduración antes mencionado cubiertas con aceite mineral. A cada gota con los COCs se le agregaron 0.5  $\mu$ g/mL (5  $\mu$ L) de LH y FSH respectivamente y se dejaron en incubación durante 44 h a 38.5°C con 5% CO<sub>2</sub> y humedad a saturación (Ducolomb *et al*, 2005).

---

## 8.2 Vitrificación

Los COCS y NkO se vitrificaron mediante el siguiente método: los ovocitos se lavaron en medio TCM-199 con PVA, y fueron expuestos a una mezcla de crioprotectores: EG y DMSO al 7.5% durante 3 min, seguido de la exposición a los mismos crioprotectores con una segunda concentración al 16%, con sacarosa 0.5 M durante 1 min. Se colocaron gotas de 10  $\mu$ L de la segunda concentración de crioprotectores para cargar los ovocitos en el recipiente (Osorio *et al*, 2010). Los ovocitos se colocaron en el recipiente Cryolock cuyo volumen es  $<0.1 \mu$ L y permanecieron vitrificados durante 30 min en nitrógeno líquido para llevar a cabo su calentamiento.

## 8.3 Calentamiento y MIV

Para el calentamiento, los ovocitos fueron expuestos a una única concentración de sacarosa (0.5 M) en 850  $\mu$ L durante 5min (Osorio *et al*, 2010). Después del calentamiento la viabilidad se determinó con la tinción del metil-tiazol-tetrazolio (MTT), considerando como vivos a los ovocitos que presentaron una coloración púrpura, y muertos a los no teñidos. Los ovocitos se maduraron en el medio TCM-199 suplementado, durante 44 h a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en el aire y humedad a saturación. Para evaluar la maduración, los ovocitos se trataron con 10mg/mL de bisbenzimidida (Hoechst 33342), un colorante fluorescente de ADN empleado en la microscopía de fluorescencia permeable a la membrana celular con alta afinidad de unión a las pares de bases teñiendo la cromatina. Los ovocitos que presentaron VG se clasificaron como inmaduros, aquellos en metafase I

---

(MI) en vías de maduración y los que se encontraron en metafase II (MII) con la presencia del primer cuerpo polar se determinaron como madurados.

#### **8.4 Fertilización *in vitro* (FIV)**

Después de la MIV, las células del cúmulo fueron removidas con una micropipeta de 100  $\mu\text{L}$  mediante acción mecánica. Los ovocitos desnudos se lavaron tres veces en gotas de 500  $\mu\text{L}$  de medio de maduración suplementado y tres veces en gotas de 500  $\mu\text{L}$  de medio amortiguado con Tris modificado (TBMm) (Medio de FIV) consistente en NaCl 113.1 mM, KCl 3.0 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7.5 mM, Tris 20 mM, Glucosa 11 mM, piruvato de sodio 5 mM, suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) fracción V al 0.4% y cafeína 2.5 mM cubiertas con aceite mineral. Para la FIV, se colocaron de 30 a 50 ovocitos en gotas de 50  $\mu\text{L}$  de medio TBMm cubiertas con aceite mineral y se incubaron a 38.5 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$  en aire y humedad a saturación durante 45 min hasta la inseminación (Ducolomb *et al*, 2005).

La muestra de semen se obtuvo mediante el método de la mano enguantada y se transportó a una temperatura de 16°C. En el laboratorio se evaluó la movilidad espermática y únicamente las muestras con un mínimo de 80% de movilidad fueron seleccionadas. Cinco mL de semen se diluyeron 1:1 con solución salina de fosfatos de Dulbecco (DPBS: Gibco, EUA), suplementada con BSA fracción V al 0.1 %, 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de penicilina potásica G y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfato de estreptomicina. Esta suspensión se centrifugó a 61 x g durante 5 min. El sobrenadante se diluyó 1:1 con DPBS y se

---

centrifugó a 1900 x g por 5 min. El sobrenadante se desechó y el paquete celular, conteniendo los espermatozoides, se suspendió en 10 mL de DPBS y se centrifugó a 1900 x g por 5 min. El paquete celular se diluyó con 100  $\mu$ L de TBM. Para el conteo espermático, se tomaron 10  $\mu$ L para hacer una dilución 1:1000 en un mL. El conteo se realizó a través de la cámara de Neubauer agregando 10  $\mu$ L de la dilución de espermatozoides a cada una de las dos cámaras. Se hizo el conteo de los cuatro cuadrantes de cada cámara y la suma total se dividió entre dos y posteriormente al resultado entre cuatro para obtener una cifra x  $10^7$  la cual se dividió entre  $10 \times 10^5$  para obtener la concentración espermática y hacer la dilución necesaria para que, al agregar 50  $\mu$ L de la suspensión de espermatozoides a la gota del medio de FIV con los ovocitos, se obtuviera una concentración final de  $5 \times 10^5$  espermatozoides/mL. Las células se colocaron en incubación durante 6 h en las condiciones antes descritas (Ducolomb *et al*, 2005).

Después del periodo de co-incubación, los ovocitos se lavaron tres veces en gotas de 50  $\mu$ L de medio de desarrollo NCSU-23 (North Carolina State University-23) (Petters y Wells, 1993), suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0.4 %; se colocaron en gotas de 500  $\mu$ L del mismo medio cubiertas con aceite mineral en placas de cuatro pozos, y se incubaron en las mismas condiciones durante 16 h para su evaluación considerando como fertilizados aquellos que presentaran 2 o más pronúcleos y dos cuerpos polares y activados los que tuvieran un pronúcleo. Los ovocitos fertilizados que se utilizaron para evaluar el DE se lavaron después de las 6 h de co-incubación, y se transfirieron a gotas de 500  $\mu$ L de medio NCSU-23 y se incubaron a 38.5 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. A las 48 y 120 h de post-co-incubación, se observaron los embriones para

---

---

determinar su estado de desarrollo. A las 144 h se observaron embriones en estado de blastocisto (Ducolomb *et al*, 2005).

### **8.5 Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI):**

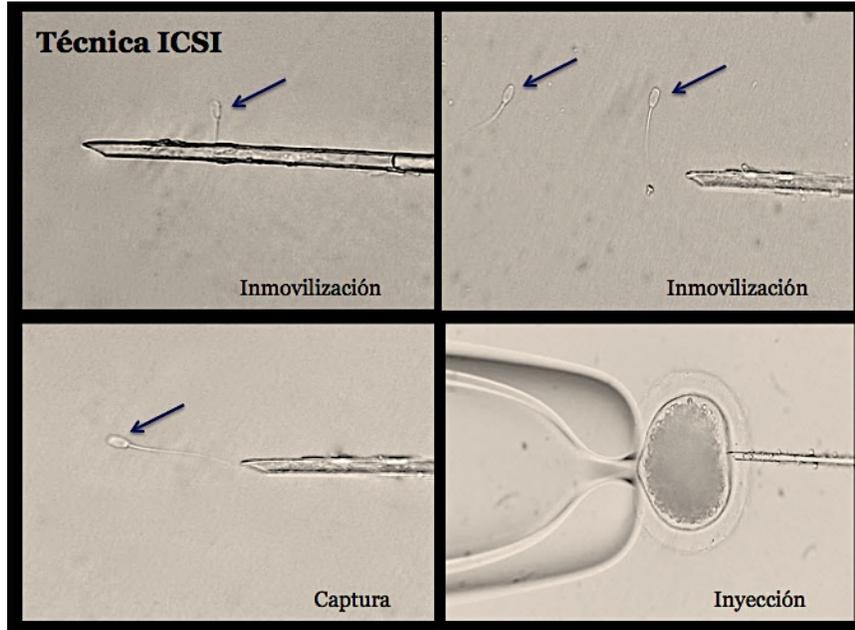
La microinyección se realizó mediante micromanipuladores acoplados a un microscopio invertido con óptica de contraste diferencial de interferencia (Nikon eclipse TE300, Japón). Cada micromanupilador presenta la inserción de dos tipos de pipetas: sujeción o "Holding" e inyección. Las pipetas de sujeción presentan un diámetro externo e interno de 150  $\mu\text{m}$  y 30  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Las pipetas de inyección tienen un diámetro externo de 10  $\mu\text{m}$  y un diámetro interno de 8  $\mu\text{m}$ . Ambas pipetas en la punta forman un ángulo de 40<sup>0</sup>, que facilita la manipulación de los gametos.

En una caja Petri se colocaron ocho gotas de 10 $\mu\text{L}$  de medio TBMm, el cual se preparó 24 horas antes y se incubó a 38.5 °C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Se colocaron 3 ovocitos por cada gota y en el centro se colocó una gota de 4  $\mu\text{L}$  de polivinilpirrolidona (PVP) al 10%, para reducir la velocidad de los espermatozoides y facilitar su captura. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  del medio con espermatozoides obtenidos por "swim up", y en un extremo se colocó una gota de 5  $\mu\text{L}$  de PVP al 10%, que se utilizó para purgar la pipeta de inyección.

Para la microinyección se llevó cuidadosamente la pipeta de inyección dentro de la PVP y se inmovilizó a un espermatozoide normal (basándose en la morfología y la movilidad) para ICSI. La inmovilización del espermatozoide se llevó a cabo golpeando hacia abajo

---

con la aguja su flagelo, y la aspiración del espermatozoide se hizo por el flagelo hacia la pipeta, permitiendo que la cabeza fuera la última porción en entrar a la pipeta de inyección. Posteriormente, ambas pipetas se movieron a la gota que contenía a los ovocitos. Los ovocitos maduros fueron sujetos mediante una presión negativa ejercida por la pipeta “holding”, manteniendo el primer cuerpo polar en la posición de las seis o las doce horas del reloj, para evitar que pudiera dañarse (Figura 7). Posteriormente, en la posición de las tres horas del reloj, se insertó en el citoplasma del ovocito la aguja con el espermatozoide en la punta, con la finalidad de facilitar la activación del ovocito y confirmar el rompimiento del oolema; se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma hacia la aguja de inyección e inmediatamente después se regresó nuevamente el citoplasma junto con el espermatozoide dentro del ovocito para asegurar que la inyección se realizara de manera correcta. La micropipeta se extrajo y el ovocito se liberó de la pipeta “holding”. Los ovocitos microinyectados se lavaron dos veces en medio TBMm y se incubaron en a 38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> en el aire y humedad a saturación (Gómez *et al*, 1997; Gómez *et al*, 1998a). Se realizó una tinción con Hoechst 33342 para evaluar la formación de pronúcleos. Se evaluaron las tasas de descondensación espermática y DE.



**Figura 7. Pasos de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides 40x.**

## **IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó una prueba estadística no paramétrica de comparación múltiple con respecto al control y entre grupos de Duncan con una  $P < 0.05$  considerando diferencia estadística significativa (Coticchio *et al*, 2004).

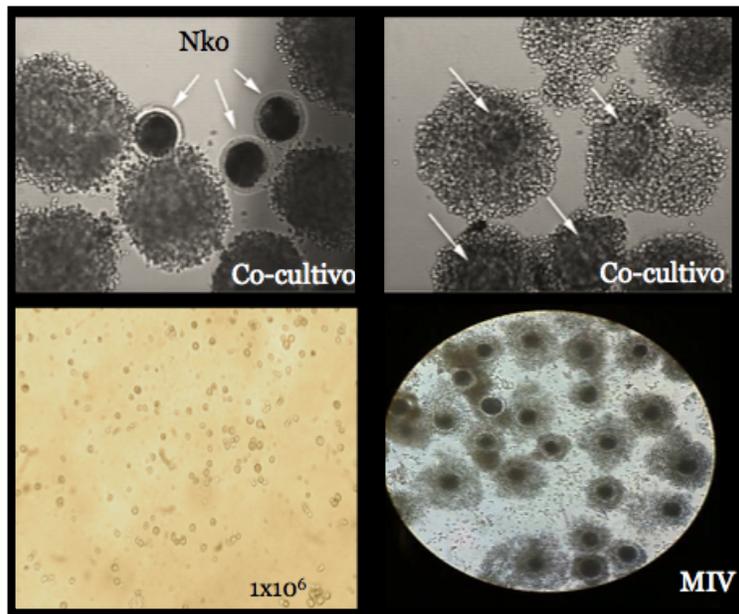
## **X. RESULTADOS**

### **1. Establecimiento del co-cultivo de células de la granulosa.**

Para establecer el co-cultivo, las células de la granulosa se obtuvieron mediante coleta del fluido folicular (granulosas antrales) y por denudación mecánica de los COCs (células

---

del cúmulo). Se obtuvo una concentración total de  $1 \times 10^6$  células por pozo contenidas en medio TCM-199 (Casillas *et al*, 2014).



**Figura 8. Co-cultivo de células de la granulosa**

Observaciones respecto al co-cultivo indicaron un posible quimiotactismo entre las células de la granulosa añadidas con los ovocitos. Estas células rodearon a los ovocitos de manera que el co-cultivo podía confundirse con ovocitos que nunca fueron desnudados (Figura 8).

## **2. Evaluación de la viabilidad después de la vitrificación de ovocitos porcinos en el recipiente Cryolock (<math><0.1\mu\text{L}</math>).**

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de la viabilidad de los ovocitos sometidos a diferentes tratamientos. En el grupo control (ovocitos frescos no vitrificados)

después de la colecta de los COCs se obtuvo un porcentaje de viabilidad después de la colecta de los COCs del 100%. Con respecto al T1 (COCs vitrificados), se observó una disminución de la viabilidad después de la vitrificación hasta un 58%, mostrando diferencia estadística significativa con respecto al grupo control. El porcentaje de viabilidad de T2 (ovocitos denudados vitrificados) fue del 90% y no mostró diferencia significativa con respecto al grupo control pero sí con respecto al T1.

**Tabla 1. Viabilidad de los ovocitos porcinos vitrificados.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Viabilidad después de la selección de COCs (%)</b>	<b>Viabilidad después de la vitrificación (%)</b>
<b>Control</b>	50/50 (100)	
<b>T1 COCs Cryolok</b>		30/52 (58) <sup>a,*</sup>
<b>T2 NkO Cryolock</b>		54/60 (90) <sup>b</sup>

Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.05).

- Diferencias vs. control

### **3. Efecto de las células de la granulosa en co-cultivo para la MIV después de la vitrificación de ovocitos porcinos en el recipiente Cryolock (<0.1µL).**

En la tabla 2 se presentan los resultados de maduración de los ovocitos sometidos a los diferentes tratamientos. En el grupo control, el porcentaje de maduración fue del 72%. Después de la vitrificación se observó una disminución significativa en los porcentajes de la maduración en los grupos T1 y T2 (37 y 49%, respectivamente). Con respecto a los

estados de maduración, en el grupo T1 se obtuvo un mayor porcentaje de ovocitos en estado de VG (42%) en comparación con el grupo control y T2. Es importante señalar que los porcentajes de rompimiento de vesícula germinal (RVG) en todos los tratamientos fue superior al 50%.

**Tabla 2. Maduración de los ovocitos porcinos vitrificados.**

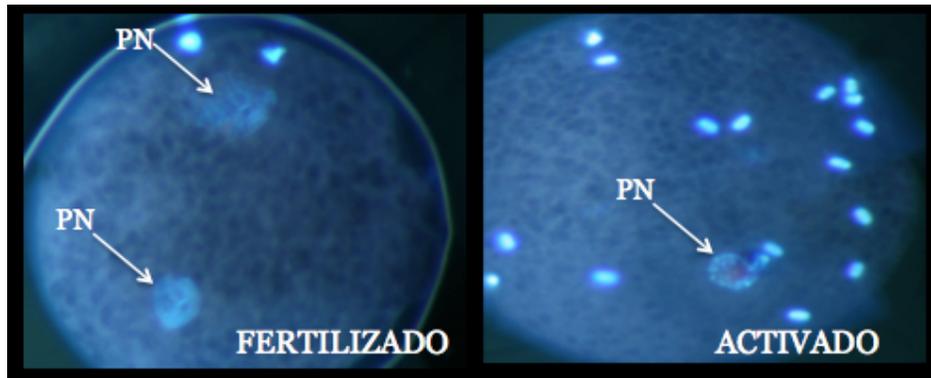
Tratamiento	Maduración MII (%)	Estados de maduración (%)		
		VG	MI	RVG
<b>Control</b>	127/177 (72) <sup>a</sup>	18/177 (10) <sup>a</sup>	32/177 (18) <sup>a</sup>	159/177 (90) <sup>a</sup>
<b>T1 COCs</b>				
Cryolock	33/90 (37) <sup>b</sup>	38/90 (42) <sup>b</sup>	19/90 (21) <sup>b</sup>	52/90 (58) <sup>b</sup>
<b>T2 NkO(CC)</b>				
Cryolock	43/87 (49) <sup>c</sup>	34/87 (39) <sup>b</sup>	10/87 (11) <sup>a</sup>	53/87 (61) <sup>b</sup>

Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

NkO (CC): Ovocitos denudados en co-cultivo para MIV.

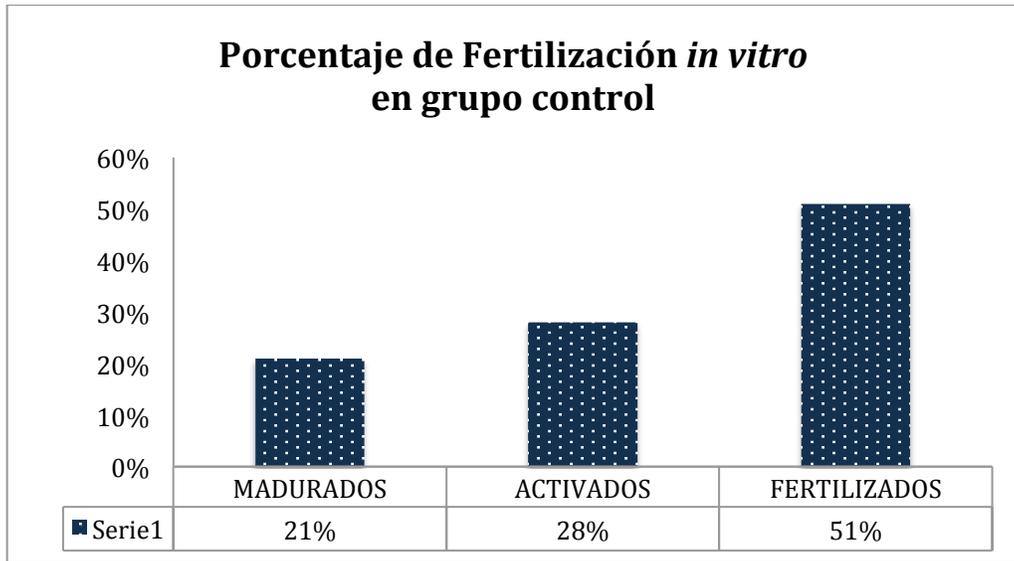
#### 4. Fertilización *in vitro* de ovocitos control

Para evaluar la fertilización *in vitro* de los ovocitos se realizó una tinción con Hoechst 33342. Se observaron bajo microscopio de epifluorescencia los diferentes estados. Su clasificación fue la siguiente: ovocitos con presencia de 2 o más pronúcleos fueron considerados fertilizados y ovocitos con un solo pronúcleo como activados (Figura 9).



**Figura 9. Clasificación de ovocitos fertilizados. Observación en microscopio de fluorescencia a 40x.**

Para descartar que los resultados obtenidos fueran por activación y partenogénesis, se realizaron dos experimentos de FIV con un número de muestra de 60 ovocitos control. El porcentaje de fertilización fue del 51%, el de ovocitos activados de 28% y el porcentaje de ovocitos no fertilizados que se mantuvieron en la etapa de la MII 21%. Posteriormente se realizó un experimento para ver desarrollo embrionario por partenogénesis y únicamente se observó división en etapas de 2-8 células. De esta manera se descartó que los embriones producidos por otros procedimientos no fueran resultado de una fertilización y fueran producidos por activación o partenogénesis (Gráfica 1).



**Gráfica 1. Porcentaje de fertilización *in vitro*.**

### **5. Desarrollo embrionario de ovocitos inmaduros vitrificados por la técnica de FIV.**

En la tabla 3 se presentan los resultados de DE obtenidos en diferentes tratamientos. Se realizaron un total de 9 experimentos con un número de ovocitos de 373 para el grupo control, 288 para T1 y 327 para T2. En el grupo control, el porcentaje de desarrollo fue de un 73% observándose una disminución para T1 y T2 de 55 y 62%, respectivamente. En cuanto a los estados embrionarios, el grupo control tuvo un mayor porcentaje de mórulas, seguido del T2 y T1 (57, 43 y 36 respectivamente). Sin embargo, el grupo T2 fue el que presentó un mayor porcentaje de blastocistos (15%) no mostrando diferencia significativa con respecto al control (10%). El grupo T1, además de haber presentado el menor porcentaje de mórulas también tuvo una disminución en el desarrollo de blastocistos (2%) con respecto a los otros grupos. Como información adicional el

porcentaje de embriones degenerados estuvo por encima del 20% en los tratamientos 1 y 2 y fue menor para el grupo control con un 14%.

**Tabla 3. Desarrollo embrionario de ovocitos inmaduros mediante la técnica de FIV**

Tratamiento	No. Total de ovocitos	Desarrollo (%)	Estado embrionario (%)			Degenerados	No divididos (MII)
			2-8 células	Mórula	Blastocisto		
Control	373	272/372 (73) <sup>a</sup>	92/272 (34) <sup>a</sup>	154/272 (57) <sup>a</sup>	41/272 (10) <sup>a</sup>	53/373 (14) <sup>a</sup>	49/373 (13) <sup>a</sup>
T1 COCs Cryolock	288	159/288 (55) <sup>b</sup>	98/159 (61) <sup>b</sup>	57/159 (36) <sup>b</sup>	4/159 (2) <sup>b</sup>	60/288 (21) <sup>b</sup>	69/288 (24) <sup>b</sup>
T2 NkO-CC Cryolock	327	202/327 (62) <sup>c</sup>	84/202 (41) <sup>c</sup>	88/202 (43) <sup>c</sup>	30/202 (15) <sup>a</sup>	83/327 (25)	42/327 (13) <sup>a</sup>

Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

NkO (CC): Ovocitos denudados en co-cultivo para MIV.

## 6. Producción *in vitro* de embriones mediante la técnica de FIV.

En las figuras 10, 11 y 12 se muestran los embriones producidos mediante la técnica de FIV en los grupos control, T1 y T2. Se logró la obtención de embriones morfológicamente de buena calidad sin diferencias con respecto a los obtenidos en el grupo control. Lograron observarse embriones tanto en estados de mórula como de blastocisto.

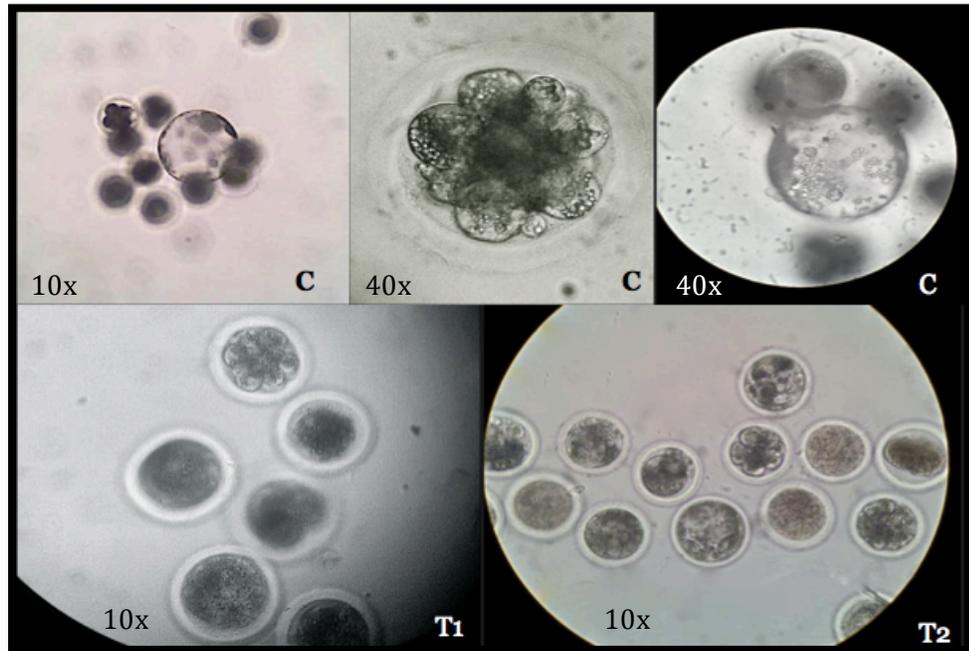


Figura 10. Producción *in vitro* de embriones por la técnica de FIV.

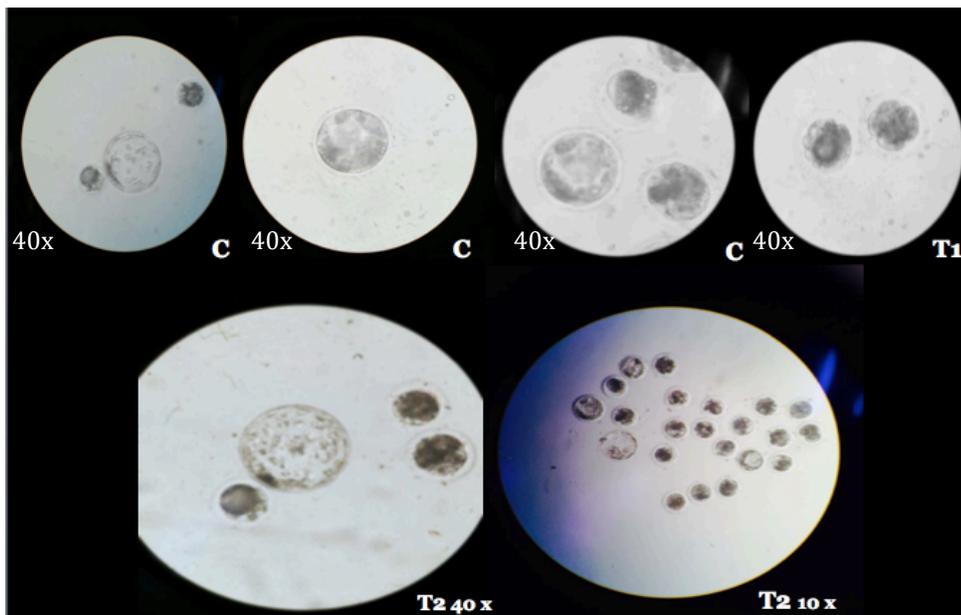
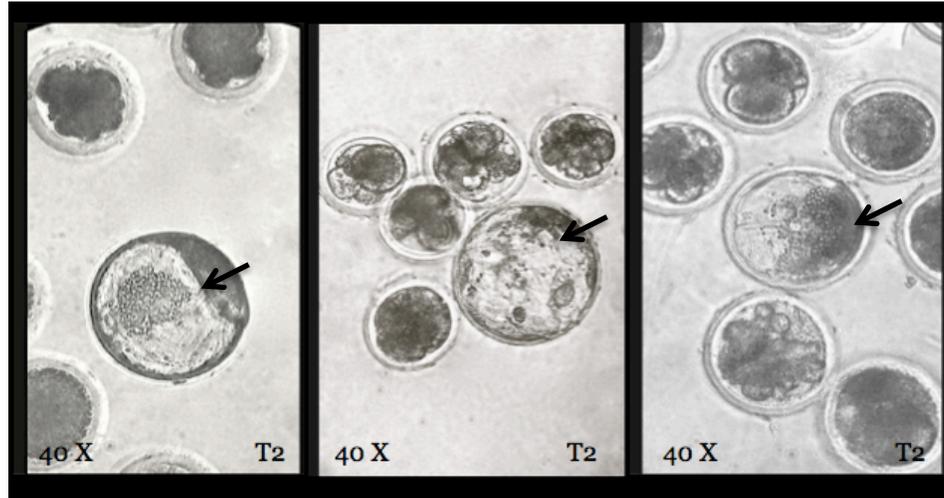


Figura 11. Producción *in vitro* de embriones por la técnica de FIV.



**Figura 12. Producción *in vitro* de embriones por la técnica de FIV. Las flechas señalan los blastocistos.**

### **7. Desarrollo embrionario de ovocitos inmaduros vitrificados y fertilizados por la técnica de ICSI.**

En la tabla 4 se muestran los resultados de DE obtenidos mediante la técnica de ICSI con diferentes tratamientos. Se realizaron 5 experimentos con un número total de ovocitos de 161 para el control, 125 para T1 y 136 para T2. El porcentaje de desarrollo en el grupo control fue del 62% sin diferencias significativas con respecto a T2 con un 69%. Con respecto a los estados embrionarios se obtuvo un mayor porcentaje de mórulas en T1 con respecto a T2 y el control. Sin embargo, los porcentajes de blastocisto fueron similares en los grupos control y T1 con 5 y 6% respectivamente. Es importante señalar que el porcentaje de embriones degenerados fue mayor en el T1 en comparación con los grupos control y T2.

**Tabla 4. Desarrollo embrionario de ovocitos inmaduros mediante la técnica de ICSI.**

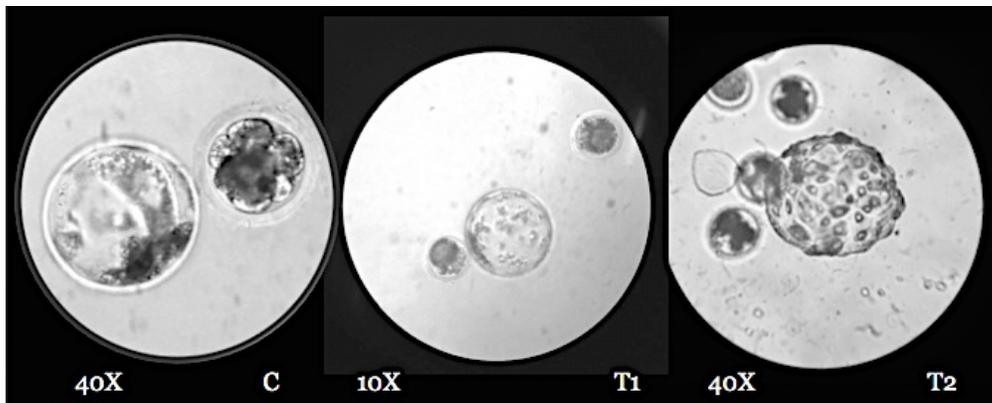
Tratamiento	No. Total de ovocitos	Desarrollo (%)	Estado embrionario (%)			Degenerados	No divididos (MII)
			2-8 células	Mórula	Blastocisto		
Control	161	100/161 (62) <sup>a</sup>	57/100 (57) <sup>a</sup>	38/100 (38) <sup>a</sup>	5/100 (5) <sup>a</sup>	39/161 (24) <sup>a</sup>	22/161 (14) <sup>a</sup>
T1 COCs Cryolock	125	70/125 (56) <sup>b</sup>	21/70 (30) <sup>b</sup>	47/70 (67) <sup>b</sup>	2/70 (3) <sup>b</sup>	38/125 (30) <sup>b</sup>	17/125 (14) <sup>a</sup>
T2 NkO-CC Cryolock	136	94/136 (69) <sup>a</sup>	37/94 (40) <sup>c</sup>	51/94 (54) <sup>c</sup>	6/94 (6) <sup>a</sup>	31/136 (23) <sup>a</sup>	11/136 (8) <sup>b</sup>

Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

NkO (CC): Ovocitos denudados en co-cultivo para MIV.

### 8. Producción *in vitro* de embriones por la técnica de ICSI.

En la figura 13 se muestran los embriones producidos mediante la técnica de ICSI en los grupos control, T1 y T2. Se logró la obtención de embriones morfológicamente de buena calidad sin diferencias con respecto a los obtenidos en el grupo control. Lograron observarse estados de mórula como de blastocisto eclosionado.



**Figura 13. Producción *in vitro* de blastocistos por la técnica de ICSI.**

---

## XI. DISCUSIÓN

La vitrificación es un método que puede emplearse para la criopreservación de tejidos, órganos e incluso organismos. Sin embargo, su uso actual ha sido en la criopreservación de gametos debido a su importancia en las técnicas de reproducción asistida humana y producción animal. Esta técnica requiere del uso de crioprotectores añadidos a los medios de vitrificación en una alta concentración y de recipientes con altas tasas de vitrificación-calentamiento para reducir la formación de cristales de hielo que puedan causar daño celular. Debido a sus características químicas, los crioprotectores son sustancias altamente tóxicas. Si su uso es inadecuado pueden causar daño celular y como consecuencia pérdida de viabilidad.

Recientemente diversos estudios se han realizado para mejorar los procedimientos de vitrificación con el objetivo de incrementar las tasas de viabilidad y producción de embriones para la obtención de crías vivas. Sin embargo, pocos estudios han evaluado los efectos en la viabilidad de los ovocitos en etapa de VG después de la vitrificación. Esto se debe a que uno de los principales factores que tienen impacto en la viabilidad, es el estado nuclear de la célula. Se sabe que los ovocitos inmaduros son más sensibles al enfriamiento en comparación con los que se encuentran en MII o en estados embrionarios (Somfai *et al*, 2012). Este impacto en la viabilidad se debe a los cambios estructurales que sufre la membrana de los ovocitos porcinos al afectarse la temperatura de transición de la fase lipídica. Actualmente se sabe que el contenido lipídico celular varía entre especies. En la especie porcina el contenido de triglicéridos es mayor en comparación con otras especies domésticas. Es por esto que debido a la alta cantidad de lípidos que poseen

---

y a la presencia de las células del cúmulo, los ovocitos inmaduros porcinos tienen una menor permeabilidad de los crioprotectores a su espacio intracelular (Jin *et al*, 2012). Diversos estudios han implementado técnicas para reducir el contenido de lípidos en esta especie, estas técnicas incluyen: deslipidación mecánica, polarización de las gotas lipídicas citoplásmicas por centrifugación y la eliminación parcial de los lípidos por micromanipulación (Vajta, 2000; Hochi *et al*, 2001; Fernández-Reyes *et al*, 2012). Esto sugiere que las bajas tasas de viabilidad se deban a una insuficiente permeabilidad de los crioprotectores.

Estudios realizados por investigaciones previas indican que la presencia de las células del cúmulo es esencial para proteger a los ovocitos contra el daño inducido por el procedimiento de vitrificación en comparación con la vitrificación de ovocitos desnudos. Sin embargo, la vitrificación de COCs reduce la viabilidad de las células del cúmulo conservando la viabilidad del ovocito. Esto es importante de considerar ya que las células del cúmulo establecen uniones comunicantes con el ovocito para el intercambio de moléculas como: AMPc, iones, piruvato, entre otras, las cuales se requieren para la adquisición de su función mitocondrial, maduración y capacidad fecundante. Por lo que mantener la viabilidad de las células del cúmulo es un factor clave para la vitrificación de ovocitos en estado de VG. Debido a lo anterior, la vitrificación de ovocitos inmaduros porcinos es más difícil que la vitrificación de ovocitos de especies como ovinos, bovinos, hámster, ratón, humano, entre otras (Wood *et al*, 1993; McEvoy *et al*, 2000; Vieira *et al*, 2002; Fernández-Reyes *et al*, 2012) y es por esto que para los criobiólogos sigue siendo un reto.

---

En este trabajo uno de los objetivos fue optimizar las condiciones del procedimiento de vitrificación con respecto a las características de los ovocitos inmaduros porcinos para incrementar las tasas de recuperación, ya que la mayoría de los trabajos se han enfocado en evaluar los efectos en ovocitos en etapa de MII o embriones obtenidos por procedimientos *in vivo* en lugar de *in vitro*, debido a las bajas tasas de éxito.

Existe una gran variedad de protocolos de vitrificación reportados en la literatura en los que el uso de crioprotectores, tiempos de exposición, recipientes, tipos celulares y estado nuclear es variado. Por lo que en este trabajo se reporta por primera vez el uso de un recipiente para la vitrificación de especies domésticas. El cryolock, presenta importantes ventajas con respecto a otros recipientes empleados actualmente en la criopreservación de gametos. Este recipiente incluye una tapa de seguridad que permite evitar la contaminación por contacto directo con el nitrógeno líquido durante su tiempo de almacenamiento. También posee altas tasas de vitrificación-calentamiento (22,000°C/min) con un volumen <0.1 uL que le permiten un incremento en la supervivencia celular al alcanzar la temperatura de transición vítrea rápidamente, impidiendo una respuesta celular. No sólo el recipiente es un factor indispensable para la vitrificación. También la elección de los crioprotectores juega un papel clave. Los crioprotectores comúnmente empleados en técnicas de vitrificación son el PROH, glicerol, DMSO, EG, sacarosa y trehalosa. Estudios realizados previamente indican que la velocidad de permeabilidad del DMSO y PROH es mayor que el EG, sin embargo, el DMSO y PROH son altamente tóxicos y se ha reportado que disminuyen las tasas de maduración (Pedro *et al*, 2005). Por este motivo estudios recientes indican que el uso de

---

---

mezclas de crioprotectores permeables es capaz de reducir su toxicidad (Cuello *et al*, 2008). En este trabajo se utilizó una mezcla de EG y DMSO a diferentes concentraciones y como crioprotector no permeable, sacarosa para optimizar la técnica de vitrificación y obtener mejores resultados.

***Viabilidad de los ovocitos inmaduros porcinos vitrificados con diferentes tratamientos.***

En este trabajo, los resultados de la viabilidad en el grupo control después de la selección de los COCs fue del 100%. El porcentaje viabilidad después de la vitrificación de los ovocitos porcinos en el recipiente cryolock fue para el T1 (COCs vitrificatos) 58% y para el T2 (ovocitos desnudos) 90%. Los resultados indican que la vitrificación disminuye la viabilidad de los ovocitos en presencia de las células del cúmulo en comparación con los ovocitos desnudos, los cuales no muestran diferencias significativas con respecto al control. En un trabajo por Fernández-Reyes *et al*, (2012) se reportan tasas de viabilidad en otros recipientes como SOPS del 17% y en Cryotop del 4%. Otro estudio por Somfai *et al*, (2010) reporta una tasa de viabilidad del 27.7% utilizando el método de SSV. Por lo que las tasas de viabilidad reportadas en la literatura se encuentran en porcentajes inferiores al 50% en comparación con los resultados obtenidos. En este trabajo, los resultados superan los reportados previamente con el uso de otros recipientes en la misma especie y estado nuclear. Esto sugiere que la vitrificación de los COCs compromete la viabilidad tanto de las células del cúmulo como del ovocito al disminuirse significativamente. Sin embargo, este efecto no se observa en ovocitos desnudos permitiendo que el crioprotector tenga una mayor permeabilidad y como

---

---

consecuencia mayores tasas de viabilidad. Además, las tasas de vitrificación-calentamiento del recipiente cryolock son superiores a los recipientes OPS, BES, SOPS, SSV, Cryotop, mostrando un impacto significativo en la viabilidad.

***Maduración in vitro de los ovocitos inmaduros porcinos vitrificados con diferentes tratamientos.***

Con respecto a los resultados de MIV, en el grupo control se obtuvo un 72%. Este porcentaje coincide con resultados obtenidos en otros estudios cuyos porcentajes de MIV varían entre un 60% por Casas *et al*, (1999), 69% por Abeydeera *et al*, (2000) y 91% por Fujihira *et al*, (2004). En el T1, el porcentaje de maduración disminuyó a un 37% y en el T2 fue del 49%. Sin embargo, a pesar de la disminución en la MIV con respecto al control, estos resultados son superiores a los reportados previamente por Fernandez-Reyes *et al*, (2012) utilizando SOPS, BES y Cryotop con porcentajes de MIV del 3-8%. Otro estudio empleando el método de SSV, reporta un porcentaje de MIV del 21.6%, el cual también es inferior en comparación con los resultados obtenidos en este trabajo.

Es importante resaltar que en el T2 (ovocitos vitrificados denudados) se obtuvo un incremento de la maduración hasta un 49% en comparación con el T1 donde se obtuvo un 37%. Esto se debe a que se implementó el uso de un co-cultivo de células de la granulosa frescas (no vitrificadas) añadidas al medio de cultivo durante la MIV. Se observó que durante el establecimiento del co-cultivo y la determinación de la concentración óptima de  $1 \times 10^6$  células/pozo, las células del cúmulo parecen re-organizarse y rodear a los

---

ovocitos en capas ordenadas por un fenómeno de quimiotactismo, que permite que a las 44 h de MIV, se expandan indicando que posiblemente las uniones comunicantes puedan ser capaces de regenerarse o de establecer otro tipo de comunicación con los ovocitos a favor del proceso de maduración. En relación a lo anterior, se ha reportado en la literatura que existen señales paracrinas por las células del cúmulo que pueden inducir la maduración (Prochazka *et al*, 2003; Wigglesworth *et al*, 2013). Por ejemplo, la reanudación meiótica y la adquisición de la capacidad fecundante pueden incrementarse por moléculas como el EGF. Este factor es un importante inductor de la reanudación meiótica en diversas especies, incluyendo la especie porcina, que no necesariamente requiere de uniones gap para poder ejercer su efecto (Prochazka *et al*, 2003). En apoyo a esto, otro estudio reciente por Sales *et al*, (2013) resalta la importante implicación de moléculas como las acuaporinas (AQPs) durante los procesos de criopreservación de gametos. Se sabe que las AQPs son canales de transporte de agua a través de la membrana, lo cual es un aspecto crítico en términos de criopreservación, debido a que un inadecuado flujo de agua puede conducir a la formación de hielo intracelular. La principal función de estos canales es regular la capacidad osmótica y el balance iónico para su adaptación ante las alteraciones a las que la célula es sometida para conservar su homeostasis. Las AQPs se dividen en tres grupos principales, las más importantes en términos de vitrificación son las acuaglicoproteínas (GLPs) ya que no solo son permeables al agua, también permiten el paso de crioprotectores como el glicerol, EG, DMSO, urea y otros solutos. Específicamente se ha identificado que las AQP3 juegan un papel importante en el transporte de los crioprotectores tanto en la especie porcina como bovina. Las AQPs se reportaron por primera vez por Denker *et al*, (1988) y fueron

---

---

identificadas principalmente en órganos como el riñón e hígado. Sin embargo, en un estudio más reciente por Skowronski *et al*, (2009) se identificó la presencia de las AQP5 en órganos reproductivos femeninos. Específicamente se demostró su presencia en las células de la granulosa. En base a nuestros resultados y después de haber señalado la importancia de las células del cúmulo, en este trabajo se demostró que mantener la viabilidad de las células del cúmulo es un aspecto esencial para la comunicación, supervivencia y maduración celular cuyo impacto se refleja en las tasas de viabilidad, MIV y DE obtenidos.

El uso de un co-cultivo de células de la granulosa para incrementar la MIV ha sido reportado en estudios previos. Un trabajo por Ge *et al*, (2008) demostró que el uso de un co-cultivo de células del cúmulo incrementaba no sólo las tasas de MIV, también de FIV en ovocitos inmaduros frescos de bovino. Sin embargo, es importante determinar la concentración óptima de células de la granulosa para el co-cultivo. Un estudio utilizando ovocitos porcinos desnudados antes de la MIV reportó que el uso de una monocapa de células del cúmulo a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/pozo no era capaz de incrementar las tasas de MIV pero sí la formación de blastocistos (Zhang *et al*, 2010). En este trabajo se demostró que el uso de un co-cultivo de células de la granulosa a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/pozo en los ovocitos vitrificados es capaz de incrementar las tasas de MIV y DE. Posteriormente, con los resultados obtenidos de MIV se realizaron las técnicas de FIV e ICSI para determinar si los ovocitos además de completar la maduración nuclear eran capaces de completar la maduración citoplásmica, ya que se sabe que la maduración nuclear no necesariamente compromete la citoplásmica.

---

---

***Fertilización in vitro de los ovocitos inmaduros porcinos vitrificados con diferentes tratamientos.***

Para la evaluar la FIV, se cuantificaron de los pronúcleos para asegurar que los resultados fueran por ovocitos fertilizados y no por activación. Además, se realizaron experimentos para descartar que los embriones producidos hayan sido efecto de partenogénesis. En este caso solamente se obtuvieron embriones partenogénéticos en estados de 2-8 células pero no de mórula y blastocisto.

Los resultados de FIV para el grupo control fueron del 73%. Estos datos coinciden con los porcentajes reportados por Ducolomb *et al*, (2003). En el T2 se obtuvieron porcentajes de desarrollo, mórulas y blastocistos del 62, 43 y 15% respectivamente, por encima de otros trabajos reportados en porcinos; Shi *et al*, (2006): 38% desarrollo y 2% blastocisto; Egerszegi *et al*, (2013): 36% de desarrollo y 8% de blastocisto y ovinos Fernández-Reyes *et al*, (2012): 28% desarrollo, 17% mórulas y 3% blastocisto. Los resultados indican que la técnica de vitrificación, el recipiente utilizado y el uso del co-cultivo permiten incrementar no sólo las tasas de MIV, si no que también DE a través de la técnica de FIV.

Debido a la importancia de las TRA, en la actualidad el uso de la FIV en humanos ha ido disminuyendo debido a las desventajas que posee. Este procedimiento no excluye eventos como la polispermia y se han obtenido nacimientos con un mayor número de hijos, lo cual, socio-económicamente ha sido contraproducente. Es por esto que el

---

---

desarrollo de nuevas TRA se ha implementado. Una de estas técnicas es la ICSI, y su uso en la actualidad supera la FIV en la mayoría de las clínicas de RA. Sin embargo, en la producción animal no se han investigado las ventajas o desventajas de ambas técnicas y pocos estudios se han realizado para determinar cual sería la mejor para la producción de crías vivas a partir de ovocitos vitrificados (Tong *et al*, 2012).

Un aspecto importante es que se sabe que la vitrificación altera la membrana del ovocito generando cambios en la bicapa lipídica, uno de los principales es su endurecimiento, modificación y ruptura (Ko *et al*, 2008). Estas alteraciones impiden el reconocimiento del espermatozoide y que la fertilización se lleve a cabo. Es por esto que en este trabajo se compararon las técnicas FIV e ICSI para la obtención de embriones a partir de ovocitos inmaduros porcinos vitrificados.

Con la ICSI: para el grupo control se obtuvo un porcentaje de DE del 62% y 5% de blastocistos. En el grupo T2 (NkO) se obtuvo un DE del 69% y 6% de blastocistos. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas con respecto al control. Sin embargo, en comparación con los resultados de FIV, se obtuvo un menor porcentaje de blastocistos. Estudios realizados en ovocitos inmaduros porcinos reportan del 39-41% de desarrollo y del 1.8-14% de blastocistos producidos por la técnica de ICSI (Fujihira *et al*, 2004 y Shi *et al*, 2007). Por lo que, los resultados en este trabajo son superiores con respecto al DE pero no al porcentaje de blastocistos que han sido reportados en la literatura.

---

---

Los resultados de este trabajo demuestran que los ovocitos vitrificados tratados por ICSI se desarrollan a blastocisto en menor porcentaje que los tratados por FIV. Este hallazgo coincide con un trabajo reportado en especies domésticas en donde hay un mayor porcentaje de fertilización empleando la técnica de FIV en comparación con ICSI (Catt *et al*, 1995). Sin embargo, pocos trabajos han sido reportados utilizando ovocitos inmaduros vitrificados, la mayoría reportan el uso de éstas técnicas en ovocitos frescos. En apoyo a los resultados obtenidos en este trabajo, otro estudio señala que con la técnica de ICSI se obtiene un mayor porcentaje de embriones degenerados y ovocitos no activados (Catt *et al*, 1995). En ovinos el porcentaje de blastocistos por FIV fue del 18.8% vs 8.5% por ICSI indicando que la FIV es una técnica más eficiente. Además este estudio señala que por FIV se logran obtener embriones de buena calidad en el tiempo adecuado y que por ICSI se ha registrado la obtención de blastocistos hasta el día 10, lo cual está indicando la obtención embriones retrasados y de mala calidad (Gómez *et al*, 1998b).

La diferencia de los resultados entre las técnicas de FIV e ICSI se pueden explicar debido a que en el procedimiento de ICSI, los espermatozoides evitan algunos de los pasos importantes que ocurren durante una fecundación natural. Que incluyen: reacción acrosomal, penetración de la zona pelúcida, fusión con el oolema, reacción cortical y activación del ovocito.

Reportes en la literatura señalan que las bajas tasas de DE por ICSI se deben a que se presenta falla en la descondensación de la cromatina espermática (Li *et al*, 1999), anomalía en los cromosomas sexuales (Hewitson *et al*, 2000), eyeción espermática,

---

---

fallas en la fertilización y singamia (Shirazi *et al*, 2009), ruptura de la membrana plasmática permitiendo el paso del medio con PVP utilizado para la selección espermática, que puede ser tóxico en altas concentraciones y principalmente por la falta de activación del ovocito (Flaherty *et al*, 1995). Esto último es importante debido a que se sabe que la activación del ovocito es esencial para la internalización de  $\text{Ca}^{2+}$ , reanudación de la meiosis y reacción cortical. En un trabajo se reportó que la activación de los ovocitos en humanos es capaz de inducirse por ICSI, sin embargo, en algunas especies domésticas como el cerdo esto no ocurre (Catt *et al*, 1995).

Por otro lado, se han propuesto mejoras para la técnica de ICSI, las cuales incluyen: tratamientos para la activación del ovocito con ionóforo de calcio, etanol, ionomicina y estímulos eléctricos cuya función es incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y 6-dimetilaminopurina cuya función permite el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto intra como extracelular (Loi *et al*, 1998; Shirazi *et al*, 2009), eliminación del acrosoma espermático por sonicación (Li *et al*, 1999), desmebranización del espermatozoide (Goto *et al*, 1990), inducción de la reacción acrosomal y el uso de técnicas de selección morfológica de espermatozoides (IMSI) e inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides (PICSI) (Parmegiani *et al*, 2010).

Con los resultados obtenidos en este trabajo sería importante realizar transferencias embrionarias para la obtención de crías vivas a partir de ovocitos en etapa de VG. Finalmente si esto se lograra sería la comprobación de la eficiencia del procedimiento de vitrificación lo cual tendría un importante impacto tanto en términos de reproducción

---

---

asistida en humanos como de reproducción animal ya que una mayor cantidad de ovocitos inmaduros puede obtenerse en comparación de ovocitos en MII o blastocistos.

## **XII. CONCLUSIONES**

- ❖ El uso de una mezcla de dos crioprotectores (EG y DMSO), del recipiente cryolock y el co-cultivo de células de la granulosa en ovocitos inmaduros vitrificados desnudos permitió obtener porcentajes de viabilidad, MIV, FIV y DE superiores que los obtenidos con COCs vitrificados.
- ❖ El co-cultivo de ovocitos inmaduros vitrificados con células de la granulosa frescas permitió conservar la viabilidad de las células de la granulosa para lograr una maduración nuclear y citoplásmica.
- ❖ La técnica de FIV es mejor que ICSI para la obtención de embriones de ovocitos vitrificados en etapa de VG.
- ❖ Se logró la obtención de embriones de buena calidad que podrían ser transferidos a hembras receptoras para la obtención de crías vivas.
- ❖ Futuros estudios serían necesarios para determinar si las células de la granulosa podrían establecer una comunicación paracrina con el ovocito para incrementar sus tasas de recuperación.

---

### **XIII. REFERENCIAS**

- Abeydeera, LR. Wang, WH. Cantley, TC. Reike, A. Murphy, CN. Prather, RS. Day, BN. (2000). Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*. 54: 787-797.
- Albarracin, J. 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. Rep. Dev.* 72: 239-249.
- Arav, A. Yavin, S. Zeron, Y. Natan, D. Dekel, I. Gacitua, H. (2002). New trends in gamete's cryopreservation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187: 77-81
- Ávila-Portillo, LM. Madero, JI. López, C. León, MF. Acosta, L. Gómez, C. Delgado, LG. Gómez, C. Lozano, JM. Reguero, MT. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Rev. Colomb. Obstet. Gineco.* 57: 291-300.
- Bajo, J. (2009). Fundamentos de reproducción. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 269-280.

- 
- Bautista, J. Kanawa, H. (1998). Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Jpn. J. Vet. Res.* 45: 183-191.
  - Betancourt, M. Bonilla, E. Casas, E. Ducolomb, Y. (2003). Maduración de gametos y fertilización en mamíferos. En *Biología Celular y Molecular*. Jiménez, F. Merchant, H. (eds) Prentice Hall. México. 683-702.
  - Bonilla, M. (2009). Reproducción asistida. Abordaje en la práctica clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 403-411.
  - 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.
  - Casillas, F. Teteltitla-Silvestre, M. Ducolomb, Y. Lemus, AE. Salazar, Z. Casas, E. Betancourt, M. (2014). Co-culture with granulosa cells improve the in vitro maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with cryolock. *Cryobiology*. 69: 299-304.
  - Catt, WJ. Rhodes, SL. (1995). Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 161-167.

- 
- Choi, YH. Love, CC. Love, LB. Varner, DD. Brinsko, S. Hinrichs, K. (2002). Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction*. 123: 455-465.
  - Cihangir, N. Gorkemli, H. Ozdemir, S. Atan, M. Duman, S. (2010). Influence of cumulus cell coculture and cumulus-aided embryo transfer on embryonic development and pregnancy rates. *J. Turkish-German Gynecol. Assoc.* 11: 121-126.
  - Coticchio, G. Rossi, G. Borini, A. Grondahl, C. Macchiarelli, G. Flamigni, C. Fleming, S. Cecconi, S. (2004). Mouse Oocyte meiotic resumption and polar body extrusión in vitro are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. *Hum. Rep.* 12: 2913-2918.
  - Cuello, C. Osorio, J. Almiñana, C. Gil, M. Parrilla, I. Roca, J. Vazquez, M. Martínez, E. Martínez, H. (2010). Superfine open pulled strawa vitrification of porcine blastocysts does not require pretreatment with cytochalasin B and/or centrifugation. *Rep. Fert. Dev.* 22: 808-817.
  - Cuello, C. Sánchez-Osorio, J. Almiñana, C. Gil, MA. Peral, ML. Lucas, X. Roca, J. Vazquez, JM. Martínez, EA. (2008). Effect of the cryoprotectant concentration

- 
- on the in vitro embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Cryobiology*. 56: 189-194.
- De Matos, DG. Furnus, CC. Moses, DF. Martinez, AG. Matkovic, M. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 68-71.
  - Denker, BM. Smith, BL. Kuhajada, FP. Agre, P. (1988). Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem.* 263: 15634-15642.
  - Downs, S. Daniel, S. Bornslaeger, E. Hoppe, P. Eppig, J. (1989). Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gam. Res.* 23: 323-334.
  - Ducolomb, Y. González-Márquez, H. Fierro, R. Jiménez, I. Casas, E. Flores, D. Bonilla, E. Salazar, Z. Betancourt, M. (2003). Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. *Theriogenology*. 79: 896-904.
  - Ducolomb, Y. Romo, S. Balcázar, J.A. Rodarte, L.F. Casas, E. Fragoso, G. Scuitto, E. Betancourt, M. (2005). Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos in vitro. *Téc. Pecu. Méx.* 43: 425-432.

- 
- Egerszegi, I. Somfai, T. Nakai, M. Tanihara, F. Noguchi, J. Kaneko, H. Nagai, T. Rátky, J. Kikuchi, K. (2013). Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after in vitro maturation in a porcine model. *Cryobiology*. 67: 287-292.
  - Epigg, J. (1991). Intercommunication between mammalian oocyte and companion somatic cells. *Bioessay*. 13: 569-574.
  - Fernández-Reyes, F. Ducolomb, Y. Romo, S. Casas, E. Salazar, Z. Betancourt, M. (2012). Viability, maturation and embryo development in vitro of vitrified immature and porcine oocytes. *Cryobiology*. 64: 261-266.
  - Flaherty, SP. Payne, D. Swann, NJ. Matthews, CD. (1995). Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod*. 10: 2623-2629.
  - Fujihira, T. Kishida, R. Fukui, Y. (2004). Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI, effects of cytochalasin B and cryoprotectants. *Cryobiology*. 49: 286-290.
  - Ge, L. Sui, HS. Lan, GC. Liu, N. Wang, JZ. Tan, JH. (2008). Coculture with cumulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cumulus

- 
- oophorus: observations of nuclear and cytoplasmic events. *Fertil. Steril.* 90: 2376-2388.
- Gómez, M. Catt, J. Evans, G. Maxwell, W. (1997). Effect of culture, incubation and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Rep. Fertil. Dev.* 9: 665-673.
  - Gómez, M. Catt, J. Evans, G. Maxwell, M. (1998a). Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Rep. Fertil. Dev.* 10: 197-205.
  - Gómez, M. Catt, J. Evans, G. Maxwell, M. (1998b). Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *Theriogenology.* 49: 1143-1154.
  - Goto, K. Kinoshita, A. Takuma, Y. Ogawa, K. (1990). Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet. Res.* 139: 494-495.
  - Hewitson, L. Simerly, C. Dominko, T. Schatten, G. (2000). Cellular and molecular events after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology.* 53: 95-104.

- 
- Hiramoto, Y. (1962). Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp. Cell. Res.* 27:416-426.
  - Hochi, S. Akiyama, M. Minagawa, G. Kimura, K. Hanada, A. (2001). Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro-matured bovine oocytes. *Cryobiology.* 42: 69-73.
  - Imoedemhe, D. Sigue, A. (1992). Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-Propanediol. *J. Assist. Rep. Genet.* 4: 323-327.
  - Jain, M.D. John, K. Paulson, J. (2006). Oocyte cryopreservation. *Fertil. Steril.* 86: 1037-1046.
  - Jin, H. Song, W. Xin, Z. Dai, S. Chen, Z. Sun, Y. (2012). Effects of cumulus cells on vitreous cryopreservation of human mature oocytes and clinical pregnancy outcomes. *Rep. Scien.* 19: 216-220.
  - Kimura, Y. Yanagimachi, R. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 52: 709-720.
  - Ko, CS. Ding, DC. Chu, TW, Chu YN, Chen IC, Chen WH, Wu GJ. (2008). Changes to the meiotic spindle and zona pellucida of mature mouse oocytes following different cryopreservation methods. *Anim. Reprod. Sci.* 105: 272-282.

- 
- Kolbe, T. Holtz, W. (2000). Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by Intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*. 15: 93-102.
  - Li, X. Hamano, K. Qian, XQ. Funachi, K. Furudate, M. Minato, Y. (1999). Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*. 7: 233-237.
  - Li, R. Murphy, C. Spate, L. Wax, D. Isom, C. Rieke, A. Walters, E. Samuel, M. Prather, R. (2009). Production of piglets after Cryopreservation of embryos using a centrifugation-based method for delipitation without micromanipulation. *Biol. Rep.* 80: 563-571.
  - Liang, Y. Srirattana, K. Phermthai, T. Somfai, T. Nagai, T. Parnpai, R. (2012). Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Cryobiology*. 65: 151-160.
  - Loi, P. Ledda, S. Filka, J. Cappai, P. Moor, RM. (1998). Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effects of activation protocols. *Biol. Reprod.* 58: 1177-1187.
  - Loyzaga, P. (2011). Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Edit. Visión Libros. Madrid, España.

- 
- Luvoni, GC. Keskintepe, L. Brackett, BG. (1996). Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 437-443.
  - Mahmoudi, R. Subhani, A. Pasbakhsh, P. Abolhasani, F. Amiri, I. Salehnia, M. Etesam, F. (2005). The effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. *Iranian J. Rep. Med.* 2: 74-78.
  - McEvoy, TG. Coull, GD. Broadbent, PJ. Hutchinson, JS. Speake, BK. (2000). Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 118: 163-170.
  - Osorio, J. Cuello, C. Gil, A. Parrilla, I. Maside, C. Albiñana, C. Lucas, X. Roca, J. Vázquez, JM. Martínez, EA. (2010). Vitrification and warming of in vivo-derived porcine embryos in a chemically defined medium. *Theriogenology.* 73: 300-308.
  - Palermo, G. Hubert, J. Devroey, P. Van-Steirteghem, A. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 340: 17-18.

- 
- Park, K. Kwon, I. Han, M. Niwa, K. (2005). Effects of partial removal of cytoplasmic lipid on survival of vitrified germinal vesicle stage pig oocytes. *J. Rep. Dev.* 51: 151-160.
  - Parmegiani, L. Cognigni, GE. Clampaglia, W. Pocognoli, P. Marchi, F. Filicori, M. (2010). Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J. Assisr. Reprod. Genet.* 1: 13-16.
  - Pedro, PB. Yokoyama, E. Zhu, SE. Yoshida, N. Jr Vakdez, DM. Tanaka, M. Edashige, K. Kasai, M. (2005). Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *J. Reprod. Dev.* 51: 235-246.
  - Petters, RM. Y Wells, KD. (1993). Culture of pig embryos. *J. Reprod Fertil Suppl.* 48: 61-73.
  - Polge, C.A. Smith, A.V. Parkes, A.S. (1949). Revival the spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature.* 164-166.
  - Portillo, B. Madero, J. Bacter, C. Bacter, M. Acosta, L. Gómez, C. Delgado, G. Gómez, C. Lozano, J.M. Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Rev. Colom. Obstet. Ginecol.* 57: 291-300.

- 
- Prentice, JR. Anzar, M. (2010). Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of Animal Genetics. Vet. Med. Int. Saskatoon, Canada.
  - Prentice, JR. Singh, J. Mapletoft, R. Anzar, M. (2012). Vitrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: effects of cryoprotectants, the vitrification procedure and warming time on cleavage and embryo development. Rep. Biol. Endoc. 10: 73-80.
  - Prochazka, R. Kalab, P. Nagyova, E. (2003). Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. Biol. Reprod. 68: 797-803.
  - Quinn, P. Margalit, R. (1996). Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryo. J. Assist. Reprod. Genet. 13: 9-14.
  - Rall, W.F. Fahy, G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature. 313: 573-575.
  - Rojas C, Palomo JM, Albarracin JL, Mogas T. (2004). Vitrification of immature pig oocytes: Study of distribution of chromosomes, microtubules and actin microfilaments. Cryobiology. 49: 211-220.

- 
- Sales, AD. Lobo, CH. Carvalho, AA. Moura, AA. Rodrigues, APR. (2013). Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Genet. Mol. Res.* 12: 6718-6732.
  - Sánchez, F. Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Bioch. Biop. Acta.* 1822: 1896-1912.
  - Schroeder, AC y Epigg, JJ. (1984). The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev. Biol.* 102: 493-497.
  - Shi, WQ. Zhu, SE. Zhang, D. Wang, WH. Tang, GL. Hou, YP. Tian, SJ. (2006). Improved development by taxol pretreatment after vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Reproduction.* 131: 795-804.
  - Shirazi, A. Ostad-Hosseini, E. Ahmadi, E. Heidari, B. Shams-Esfandabadi, N. (2009). In vitro development competence of ICSI-derived activated ovine embryos. *Theriogenology.* 71: 342-348.
  - Skowronski, MT. Kwon, TH. Nielsen, S. (2009). Immunolocalization of aquaporin 1, 5 and 9 in the female pig reproductive system. *J. Histochem. Cytochem.* 57: 61-67.

- 
- Somfai, T. Ozawa, M. Noguchi, J. Kaneko, H. Nakai, M. Maedomari, N. Ito, J. Kashiwazaki, N. Nagai, T. Kikuchi, K. (2008). Live piglets derived from in vitro produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol. Rep.* 80: 42-49.
  - Somfai, T. Kashiwazaki, N. Ozawa, M. Nakai, M. Maedomari, N. Noguchi, J. Kaneko, H. Nagai, T. Kikuchi, K. (2008b). Effect of centrifugation treatment before vitrification on the viability of porcine mature oocytes and zygotes produced in vitro. *J. Rep. Dev.* 54: 149-155.
  - 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.
  - Somfai, T. Kikuchi, K. Nagai, T. (2012). Factors affecting cryopreservation of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 58: 17-24.
  - Sukardi, S. Curry, M. Watson, P. (1997). Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim. Rep. Sci.* 46: 89-96.

- 
- Tatemoto, H. Sakurai, N. Muto, N. (2010). Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63: 805-810.
  - Tharasanit, T. Colleoni, S. Galli, C. Colenbrander, B. Stout, T. (2009). Protective effects of the cumulus-corona radiata complex during vitrification of horse oocytes. *Reproduction.* 137: 391-401.
  - Tong, XH. Wu, LM. Jin, RT. Luo, LH. Luan, HB. Liu, YS. (2012). Fertilization rates are improved after IVF if the corona radiata is left intact in vitrified-warmed human oocytes. *Hum. Reprod.* 22: 3208-3214.
  - Ucar, O. Parkinson, T. (2003). In vitro induction of the acrosome reaction in ovine spermatozoa by calcium ionophore A23187. *Acta. Vet. Hungar.* 51: 103-109.
  - Uehara, T. Yanagimachi, R. (1976). Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.* 15: 467-470.
  - Urbina, C Biber, L. (2008). Fertilidad y reproducción asistida. Edit. Médica Panamericana. Venezuela.

- 
- Vajta G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Rep. Sci.* 60: 357-364.
  - Vieira, AD. Mezzalira, A. Barbieri, DP. Lehmkuhl, RC. Rubin, MI. Vajta, G. (2002). Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology.* 45: 91-94.
  - Wigglesworth, K. Lee, KB. Peng, J. Matzuk, M. Eppig, J. (2013). Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: 723-729.
  - Wongsrikeao, P. Kaneshige, Y. ooki, R. Taniguchi, M. Agung, B. Nii, M. Otoi, T. (2005). Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 40: 166-170.
  - Wood, MJ. Barros, C. Candy, C. Carrol, CJ. Melendez, J. Whittingham, DG. (1993). High rates of survivals and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulphoxide. *Biol. Reprod.* 49: 489-495.
  - Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization in the physiology of reproduction. Knobil, E. y Neill, JD. (Edit) 2nd Ed. New York. 189-317.

- 
- Yamauchi, Y. Yanagimachi, R. Horiuchi, T. (2002). Full term development of golden hamster oocytes following Intracytoplasmic sperm head injection. *Biol. Reprod.* 67: 534-539.
  - Yoshida, M. Ishigaki, K. Nagai, T. Chikyu, M. Pursel, VG. (1993). Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. Reprod.* 49: 89-94.
  - Zhang, M. Ouyang, H. Xia, G. (2009). The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol. Hum. Rep.* 7:399-409.
  - Zhang, X. Miao, Y. Zhao, J. Spate, L. Bennett, M. Murphy, C. Schatten, H. Prather, R. (2010). Porcine oocytes denuded before maturation can develop to the blastocyst stage if provided a cumulous cell-derived co-culture system. *J. Anim. Sci.* 88: 2604-2610.

**Tinción con Hoechst**

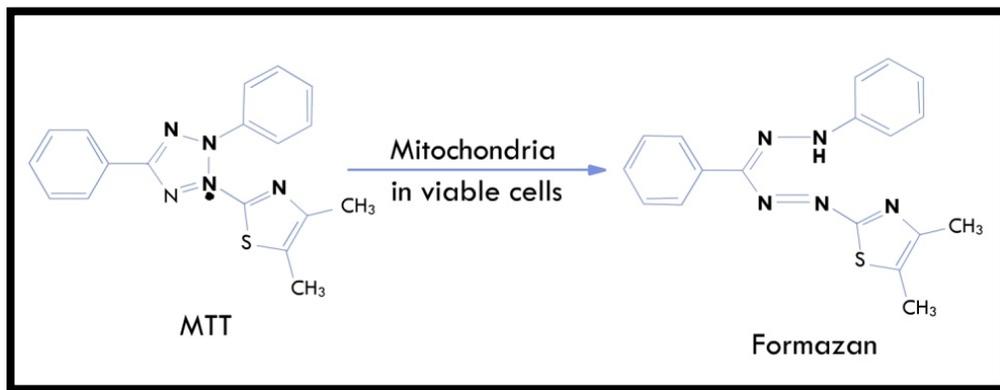
El Hoechst es un colorante fluorescente de ADN empleado en la microscopía de fluorescencia. El colorante es excitado por luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a los 350 nm con un máximo de emisión de alrededor de 461 nm. Es altamente permeable a la membrana celular con alta afinidad de unión a las pares de bases tiñendo la cromatina.

Después de la MIV o FIV, en el caso de los ovocitos que fueron madurados, remover las células de la granulosa por acción mecánica con una pipeta de 100  $\mu$ L o con una pipeta Pasteur. Para los ovocitos de la MIV y FIV, agregar 500  $\mu$ L de fijador glutaraldehído por cada pozo. Dejarlos en fijación durante 20 min, ya sea en refrigeración o a temperatura ambiente. Posteriormente pasar los ovocitos a otra caja de 4 pozos y agregar a cada uno 300  $\mu$ L de PBS. Realizar un lavado a los ovocitos para quitar el exceso de PBS para después aplicar 300  $\mu$ L de Hoechst por pozo. Cubrir la caja de 4 pozos con aluminio y dejarlos en refrigeración durante 40-45 min. Finalmente realizar nuevamente un lavado a los ovocitos con PBS para quitar el exceso de Hoechst y realizar el montaje.

---

## Tinción con MTT

La tinción de MTT es un ensayo colorimétrico para la medición de la actividad de las enzimas celulares mitocondriales que reducen el colorante de tetrazolio, MTT, a sales de formazán, dando una coloración púrpura (Figura 14). Para realizar la tinción de MTT, colocar en la caja de 4 pozos, conteniendo a los ovocitos, 100  $\mu\text{L}$  de MTT y guardar en incubación durante 1 h 30 min para su evaluación.



**Figura 14. Reducción metabólica del MTT a sales de formazán por células vivas.**