



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS PORCINOS Y SU EFECTO EN LA DISTRIBUCIÓN DE
MICROFILAMENTOS Y CROMATINA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

BIÓL. EXP. ALMA GUADALUPE LÓPEZ LÓPEZ

DIRECTOR

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

ASESORAS

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ

MBRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS ÁVALOS

CDMX., junio de 2018

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

Profesora 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

MBRA. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Profesora Asociada "D"

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología Reproductiva

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 598630 y becario otorgado por CONACyT 592911.

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: **“VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS PORCINOS Y SU EFECTO EN LA DISTRIBUCIÓN DE MICROFILAMENTOS Y CROMATINA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO”** que presentó Alma Guadalupe López López el día 04 de junio del 2018.

PRESIDENTE

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

SECRETARIO

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza
Universidad Nacional Autónoma de México

VOCAL

MBRA. Miriam Fahiel Casillas Avalos
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

VOCAL

Dra. Edith Arenas Ríos
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y fue apoyado por CONACyT, México. (CVU/Nº de becario: 598630/592911).

Al rastro “Los Arcos” Edo. De México por la donación de los ovarios.

Con gran admiración al Dr. José Miguel Betancourt Rule, por abrirme las puertas a su equipo de trabajo y rápidamente hacerme sentir uno más. Por su apoyo académico y sobre todo por la enseñanza personal, por enseñarme aquellas cosas que no se aprenden en los libros de texto.

A la MBRA. Miriam Fahiel Casillas Avalos porque estuvo ahí desde un principio, por ser parte desde el comienzo y haber estado para mí, no solo como mi maestra personal sino como una amiga. Por enseñarme todo lo que sé sobre esta hermosa área, por la paciencia y los ánimos cuando la ciencia hace de las suyas. Por siempre tratarme como una igual.

Con cariño a la Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez, por estar al pendiente y siempre aplaudir cuando las cosas salían bien y animar cuando era tiempo de volverlo a intentar. Por todas sus sugerencias, enseñanzas y ser parte importante de esto.

Al MBRA. Mario Teteltitla Silvestre por ser parte del trayecto desde antes, por la ayuda incondicional en el laboratorio y por compartir su conocimiento.

A todo el grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Celular, a los que estuvieron en un principio y que ahora siguen otro camino; a los que llegaron y permanecen. A todos los que de una u otra manera aportaron a este proyecto, con su experiencia, con intercambiar ideas. Porque en ocasiones lo único que necesitamos es alejarnos de la rutina con una sonrisa.

A ustedes, gracias.

DEDICATORIA

Al motor de mi vida, mi familia. A ustedes para lo que tengo por decirles nunca será suficiente una vida entera y menos un papel. No hay nada que no les haya dicho ya, sin embargo, nunca me cansaré de repetirlo. Resulta que este camino, este viaje, es más ligero porque ustedes están. Esta vida es hermosa porque ustedes me enseñaron a vivirla, es hermosa por vivirla con ustedes. Los amo.

Mamá, por ti estoy acá. Por decirme esa noche, “yo veré cómo le haré, pero tú te vas a estudiar, mi reina” y esa misma noche ya tenía la maleta hecha. Por estar al pendiente, por corregir cuando fue necesario y por nunca dudar pese a eso. Por consolarme aun estando lejos. Por todas las fechas que no hemos pasado juntas.

Papá, tú eres mi complice y mi mayor admirador. Me encanta saber que te llenas la boca de flores cada vez que hablas de mi, mi corazón también lo hace. Por ser mi consejero y la primera persona a la que recurro porque sé que me ayudará a encontrar la solución. Por enseñarme que los monstruos no existen pero que siempre estará papá cuando se quiera asomar alguno. Por preguntarme si soy feliz. Y sí, lo soy.

Alex, Dani y Lalo. Si me dieran a elegir, los volvería a tomar siempre. Porque sé que cuando falten Na’ Alma y Ta’ Ale siempre nos mantendremos y porque esta vida siempre tendrá solución con ustedes. Por ser mis mejores amigos, mis ejemplos, mis consejeros, por cuidarme siempre y confiar en mi, por ayudarme en el camino.

A mis chaparros, Alix, Elián y Manyi. Me encanta verlos crecer y ser felices. Ansio verlos triunfar y continuar plenos. Una gran vida les espera.

A Isme, porque en los días en que quería renunciar era lo más bonito que aparecía. Por tu motivación, tu apoyo y paciencia, tu tiempo, tu cariño. Por hablarle de mi en tus oraciones. Por acompañarme en este viaje y permanecer. Por arriesgarte.

A Sandra, Katia, Ximena, Damaris y Mariana, porque más que ser mis compañeras son mis amigas, por siempre hacerme sentir acompañada estando lejos de los míos. Por hacerme sentir que no estaba del todo sola en esta ciudad. Por las vivencias y las anécdotas. A los que no les puse nombre, pero saben y sé que estuvieron. Las quiero.

*“Nada en la vida debe temerse, solo debe ser
entendido. Ahora es momento de comprender más,
para que podamos temer menos”.*

Marie Curie

RESUMEN

La vitrificación es una técnica de criopreservación empleada principalmente en gametos. Esta técnica tiene como finalidad mantener la viabilidad celular, su funcionalidad y su potencial de desarrollo a -196°C . Durante este proceso se requiere de la adición de agentes crioprotectores (CPAs), que son sustancias que confieren protección a las células durante el proceso. La selección de la técnica de vitrificación adecuada; depende de la especie animal, el tipo celular y la naturaleza de los CPAs que se utilizan. La toxicidad producida por el uso de los CPAs durante la vitrificación puede causar alteraciones en los microfilamentos (MF) y en la cromatina (CR), esto puede repercutir en la viabilidad, la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario (DE). En estudios previos, se ha evaluado el efecto de la vitrificación en ovocitos en estados de VG y MII, cigotos y blastocistos en la misma etapa de desarrollo en la que fueron vitrificados. Además, estos estudios atribuyeron el papel de los MF y la CR a la disminución de la fertilización y la producción embrionaria, pero no se evaluó la distribución de estas estructuras. Por lo que en este estudio se examinó de qué manera la vitrificación de ovocitos porcinos inmaduros afecta a la distribución de los MF y la CR, así como su repercusión en el DE temprano. La vitrificación, produjo alteraciones en la distribución de la actina cortical (AC) y desarreglo en la compactación de la CR en los embriones, por lo que la fertilización y el DE temprano disminuyeron.

ABSTRACT

The vitrification technique is a type of cryopreservation used mainly in gametes. This technique allows to maintain cell viability, functionality and development potential at -196 ° C. During this technique, the addition of cryoprotective agents (CPAs) is required, which are substances that confer protection to the cells during cooling and warming. Also, the animal species, the cell type and the nature of the CPAs that are used to select the appropriate vitrification technique depends on its success. The toxicity produced by the CPAs during vitrification can cause alterations in microfilaments (MF) and chromatin (CR), also affecting cell viability, maturation, fertilization and embryo development (ED). Previous studies, have evaluated the vitrification effects on oocytes in VG and MII stages, zygotes and blastocysts in the same stage of development in which they were vitrified. In addition, these studies evaluated the role of MF and CR based on the rate of fertilization and embryo production, but not on the distribution of these structures. Therefore, this study was designed to evaluate how the vitrification of immature porcine oocytes affects the distribution of MF and CR, as well as its repercussion in the early ED. In the present study, alterations in the distribution of cortical actin (CA) and disarrangement in the compaction of CR in embryos produced from vitrified oocytes were obtained, reducing the fertilization and early ED rates.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINAS
I. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 De la criobiología a la criopreservación.....	11
1.2 Métodos de criopreservación.....	12
1.3 Crioprotectores.....	14
1.4 Recipientes o soportes físicos.....	18
1.5 Técnicas de reproducción asistida.....	19
1.6 Estructuras celulares: membrana plasmática, citoesqueleto y cromatina..	22
1.7 Meiosis y fecundación.....	31
II. ANTECEDENTES.....	34
III. JUSTIFICACIÓN.....	38
IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	39
V. HIPÓTESIS.....	39
VI. OBJETIVOS.....	39
6.1 Objetivo general.....	39
6.2 Objetivos particulares.....	39
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	40
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
8.1 Selección de complejos ovocito-células del cúmulo (COCs)	42
8.2 Maduración in vitro (MIV)	42
8.3 Vitriificación.....	43
8.4 Calentamiento.....	43
8.5 Fertilización in vitro (FIV)	44

	8.6 Inmunocitoquímica y tinción de Hoechst (distribución de microfilamentos y cromatina)	45
	8.7 Viabilidad.....	47
IX.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
X.	RESULTADOS.....	48
	10.1 Evaluación de la viabilidad de ovocitos y embriones tempranos.....	48
	10.2 Evaluación de la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	50
	10.3 Evaluación de la fertilización <i>in vitro</i>	51
	10.4 Evaluación del desarrollo embrionario.....	54
	10.5 Evaluación de la distribución de microfilamentos en embriones tempranos.....	55
	10.6 Evaluación de la distribución de cromatina en embriones tempranos.....	59
XI.	DISCUSIÓN.....	64
XII.	CONCLUSIÓN.....	80
XIII.	PERSPECTIVAS.....	81
XIV.	REFERENCIAS.....	82

I. INTRODUCCIÓN

1.1 De la criobiología a la criopreservación

La criobiología es la rama de la biología encargada de estudiar y entender los efectos de las bajas temperaturas en los seres vivos, ya sea derivado de características naturales propias de algunas especies o de manera inducida, como los métodos de criopreservación. En la práctica: proteínas, células, tejidos, órganos y organismos completos han sido objeto de estudio de los efectos de la exposición a temperaturas bajas, ya sea para uso clínico o de investigación (Ávila- Portillo *et al*, 2006; Borini y Coticchio, 2009; Chian, 2010; Casillas *et al*, 2015 b).

Dentro de las principales áreas de estudio de la criobiología se encuentra la criopresevación. Esta es una técnica utilizada para la preservación de células, tejidos, gametos y embriones; cuyo objetivo es mantener la viabilidad, funcionalidad y el potencial de desarrollo celular a bajas temperaturas (Ávila- Portillo *et al*, 2006; Chian, 2010; Casillas *et al*, 2014). También permite comprender los efectos del descenso de la temperatura en los sistemas biológicos, ya que el metabolismo celular tiene como consecuencia el envejecimiento, lo que puede ocasionar que, como resultado de ésto, las reacciones bioquímicas puedan ser perjudiciales para las funciones celulares elementales debido al tiempo biológico; sin embargo, este último puede ser detenido mediante la conservación a bajas temperaturas hasta su posterior calentamiento y con ello lograr la postergación del

envejecimiento celular (Ávila- Portillo *et al*, 2006).

La criopreservación de gametos de mamíferos surgió en 1945, mediante un estudio en el cual se observó que la viabilidad de espermatozoides de humano, después del calentamiento, era mayor cuando fueron congelados a temperaturas de -79 °C y -196 °C (Parkes, 1945). Posteriormente, en 1983, se reportó el primer nacimiento humano producto de la criopreservación de embriones y de la implementación de la fertilización *in vitro* (FIV) como técnica de reproducción asistida (TRA) (Trounson *et al*, 1983). Sin embargo, fue hasta 1986 que se reportó la primera criopreservación exitosa de ovocitos humanos, la cual fue reflejada en un embarazo gemelar tras el uso de la FIV (Chen, 1986). En gametos y embriones, la criopresevación ha sido una herramienta utilizada ampliamente como recurso de apoyo a las TRA, por lo que el avance científico de ambos recursos ha sido de manera paralela.

1.2 Métodos de criopreservación

Existen dos métodos de criopreservación, la congelación lenta o convencional y la congelación ultra-rápida o vitrificación. Depende de la especie animal, el tipo celular y la naturaleza de los agentes crioprotectores (CPAs) que se utilizan, para seleccionar la técnica de criopreservación adecuada. Durante la criopreservación se requiere de la adición de CPAs, que son sustancias que confieren protección a las células durante el congelamiento y calentamiento.

Congelación lenta o convencional. Esta técnica tiene como principio la

deshidratación progresiva de la célula o embrión como respuesta al cambio osmótico, de tal manera que, las células incorporan lentamente el CPA al mismo tiempo que se van deshidratando. A su vez, durante esta técnica se emplea equipo especializado como cámaras de congelación y almacenaje para descender de forma gradual la temperatura de las células, que van desde -4 °C, -30/-40 °C, -80 °C hasta a -196 °C (Somoskoi *et al*, 2015).

La congelación lenta se basa en: 1) el equilibrio de las células y embriones en una solución crioprotectora hiperosmótica suplementada, a bajas concentraciones (1-2 M), antes del enfriamiento y 2) el enfriamiento lento a -30/-40 °C (para el caso de embriones) antes de sumergirse en nitrógeno líquido (N₂L), y 3) almacenamiento a largo plazo a -196 °C en N₂L (Somoskoi *et al*, 2015).

Congelación ultra-rápida o vitrificación. El fundamento de esta técnica consiste en pasar del rango de temperatura crítica (-30 °C a -80 °C) hasta los -196 °C de forma ultra-rápida mediante la transición de una solución acuosa en estado líquido a un estado sólido vítreo evitando la formación de cristales de hielo en el interior de la célula, de esta manera se pretende reducir el riesgo de daño en estructuras celulares (Vajta, 2000).

Esta técnica ha sido utilizada ampliamente en tejido ovárico, testicular y en ovocitos de especies como el porcino (Casillas *et al*, 2014), el ovino (Fernández-Reyes *et al*, 2012), los humanos (Lei *et al*, 2014), entre otros. Con el empleo de CPAs durante este proceso, se conserva a las células en N₂L a -196 °C con lo cual los procesos bioquímicos, estructurales y fisiológicos quedan detenidos hasta su calentamiento.

La vitrificación ha sido considerada como el método más utilizado en la actualidad debido a dos factores principales. Primero, es un método más rápido, más simple, menos costoso y que no requiere equipo sofisticado comparado con la congelación lenta; segundo, alcanza tasas de enfriamiento y calentamiento óptimas establecidas que aumentan la supervivencia, a su vez, reduce el daño producido por la formación de hielo intracelular y por la deshidratación excesiva común en protocolos de congelación lenta, lo que conduce a mejores resultados (Fahy, 2016).

Las tasas críticas de enfriamiento y calentamiento dependen en gran medida de la naturaleza química y de la concentración de los CPAs. Los CPAs utilizados para la vitrificación generalmente son los mismos o similares a los que se usan en la congelación lenta (Fahy y Wowk, 2015). Una desventaja de la vitrificación es la necesidad de emplear altas concentraciones de CPAs, lo cual aumenta el riesgo de daño osmótico y de la citotoxicidad ocasionada por la naturaleza química de estos agentes, además, se puede presentar escisión de la zona pelúcida (ZP) en el caso de los ovocitos (Fahy, 2016).

1.3 Crioprotectores

Los CPAs son sustancias hidrosolubles y generalmente de baja toxicidad. Disminuyen la temperatura en la que ocurre la transición del agua de estado líquido a sólido, de manera que interactúan con sus moléculas reduciendo la capacidad de formación de enlaces entre ellas (alteración de los puentes de hidrógeno). Así mismo, interaccionan con otras moléculas biológicas estableciendo puentes de hidrógeno, de manera que

evitan la pérdida de su estructura original. Los CPAs se distribuyen en el espacio citoplásmico de la célula, desplazando al agua y ocupando su lugar (Bajo, 2009).

El éxito de la preservación de los gametos por este método se ve reflejado en gran medida por la reducción del daño que causa la formación de cristales de hielo en el interior de la célula y por una inapropiada deshidratación, esto se logra mediante la elección correcta de los CPAs y de sus concentraciones, ya que, estos agentes no tienen la misma capacidad de difusión en todos los tipos celulares (Borini y Coticchio, 2009).

Con base en la permeabilidad y capacidad de atravesar la membrana celular, los CPAs se clasifican en dos tipos:

- 1) Permeables o intracelulares**, estos presentan bajo peso molecular y son capaces de penetrar rápidamente a la célula, éstos actúan disminuyendo el punto de congelación, interaccionan con la membrana manteniendo su estructura y previenen la interacción de los electrolitos, que son capaces de unirse a éstos. Algunos de los más utilizados son el etilenglicol (EG), el 1,2-propanediol (PROH), el glicerol (GL) y el dimetilsulfóxido (DMSO) (Fernández- Reyes *et al*, 2012).
- 2) Impermeables o extracelulares**, presentan peso molecular alto y promueven una rápida deshidratación aumentando el gradiente de osmolaridad, ayudando de forma indirecta a la difusión del CPA permeable. Se dice que este tipo de compuestos funcionan de manera asociada con los CPAs intracelulares. Los más utilizados son los azúcares como la sacarosa y la trehalosa y macromoléculas

como la polivinilpirrolidona (PVP) y el ficol (Bajo, 2009).

El CPA debe tener la capacidad de penetrar las membranas celulares para así difundirse y tomar el lugar que ocupa el agua en el interior, además de permanecer en estado vítreo a baja temperatura; es importante considerar que la determinación de la concentración del CPA es fundamental, ya que de ello dependerá el que cumpla el papel de agente protector, y así, reducir su capacidad de agente citotóxico.

Los CPAs pueden interactuar entre sí en una mezcla o con moléculas celulares cruciales (agua, lípidos, proteínas, etc.) produciendo efectos distintos a los que se producirían de manera individual. Se ha observado que la combinación de CPAs confiere mayor efecto protector, que la acción individual o aditiva de estos, sin embargo, la elección de los CPAs para realizar la mezcla dependerá en gran medida de la especie y tipo celular (Vicente y García-Ximénez, 1994; Chian *et al*, 2004; Eroglu *et al*, 2009).

La toxicidad de los CPAs se debe principalmente a dos causas. El primero, es la reacción química realizada con las células antes de la criopreservación, y el segundo, es el efecto químico ocasionado por el cambio de ósmosis de las soluciones de congelación. Aunado a esto, el descenso del punto de congelación (derivado de la concentración de la mezcla) de los CPAs está relacionado con su permeabilidad celular de estos, lo que puede causar estrés osmótico en las células antes de la vitrificación. Por lo que, al buscar reducir el riesgo de daño por toxicidad es importante

considerar implementar la mezcla y concentración óptima de CPAs, el tiempo y la temperatura de exposición adecuada de estos (Chian, 2010).

Se ha propuesto que un importante factor de daño ocasionado por los CPAs puede ser la desnaturalización de proteínas. Se ha atribuido que los efectos tóxicos de las soluciones de vitrificación se deben a la fuerte interacción entre los CPAs permeables (particularmente el DMSO) y el agua, que pueden causar daño al afectar la hidratación de la proteína. Debido a la interacción de estos agentes permeables con la capa de hidratación de moléculas de agua (o capa de solvatación) que rodea a las superficies proteicas. Esta capa es la que hace posible la hidratación de las células y tejidos en los seres vivos. Cualquier factor que modifique la interacción de la proteína con el agua, la desaparición total o parcial de esta envoltura acuosa o la ruptura de puentes de hidrógeno, disminuirá su estabilidad ocasionando la desnaturalización. La mayoría de las proteínas pueden desnaturalizarse cuando son expuestas a temperaturas por debajo de 10 °C y 15 °C. Estas interacciones podrían explicar los cambios en la polimerización y agregación de actina dependiente de la temperatura y de los microtúbulos, que es un factor importante en la desestabilización del huso meiótico y, por lo tanto, de la disgregación de la cromatina (Fahy y Wowk, 2015; Fahy, 2016).

Los CPAs usados individualmente para vitrificar tienen efecto tóxico a concentraciones más bajas que las requeridas para desnaturalizar proteínas. Cada vez es mayor el uso de mezclas de dos o más CPAs en las soluciones de vitrificación, ya que presentan una menor toxicidad en la célula que el uso individual de los CPAs a las mismas concentraciones (Fahy, 2016), por ejemplo, se ha reportado que la vitrificación de

ovocitos maduros de búfalo con 40% de EG o 40% de DMSO, presentan tasas de desarrollo hasta mórula menores (7.2% y 8%, respectivamente), comparados con aquellos que fueron vitrificados con una mezcla de 20% de EG + 20% de DMSO (11.5%) (Gautam *et al*, 2008), lo que sugiere que el uso de mezclas reduce la toxicidad específica de cada CPA y lo sustituye con la desnaturalización asociada a altas concentraciones de agregados (Fahy, 2016).

1.4 Recipientes o soportes físicos

Otro requerimiento importante para la vitrificación es el uso de los recipientes o soportes físicos, éstos permiten preservar la integridad de la célula durante el proceso de vitrificación. La elección de un recipiente adecuado permitirá garantizar la viabilidad e integridad de las muestras durante su almacenamiento en en el N₂L (Somfai *et al*, 2008).

Se ha reportado que el uso del recipiente “Cryolock” es una herramienta importante para la reproducción asistida. En biotecnología animal su uso ha ido en ascenso gracias a las ventajas que presenta en comparación a otros soportes como las pajillas OPS, SOPS, Cryotip, Cryoloop y Cryotop, ya que es posible manejar volúmenes mínimos (<0.1 µL) de CPAs, lo cual representa una mayor ventaja durante la vitrificación de ovocitos y embriones (Casillas *et al*, 2014).

Al manejar volúmenes mínimos se reduce el riesgo de toxicidad, además, se evita la posible contaminación causada por la exposición al N₂L ya que éste puede contener

bacterias termófilas, por lo que, se emplea N₂L estéril en laboratorios de reproducción asistida (Bajo, 2009).

1.5 Técnicas de reproducción asistida (TRA)

En los últimos años los métodos de criopreservación, como la vitrificación, han sido una herramienta muy importante en las TRA, siendo un recurso importante en el tratamiento de afecciones reproductivas y de infertilidad en humanos, así como para mejorar la capacidad y calidad reproductiva en especies con importancia económica en la producción animal y en especies en peligro de extinción (Mullen y Fahy, 2012).

En la actualidad, algunas de las TRA que han sido importantes y más utilizadas, tanto para la reproducción asistida humana como para la producción animal, son la FIV y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

En mujeres, la técnica de FIV requiere de estimulación hormonal previa para una sobreproducción de ovocitos, conocida como superovulación. Los ovocitos son obtenidos mediante laparoscopía, posteriormente se procede a realizar la FIV hasta la obtención de embriones para su transferencia. La obtención de ovocitos de mamíferos con importancia en la producción animal se realiza por colecta en el rastro o por laparoscopía, los cuales se someten a maduración *in vitro* (MIV) para posteriormente ser fertilizados y cultivados hasta el desarrollo embrionario (DE).

A diferencia de la FIV, la ICSI se realiza por la introducción directa del espermatozoide

al ovocito mediante el empleo de micromanipuladores acoplados a un microinyector, asegurando que la inseminación sea por un solo espermatozoide (Casillas *et al*, 2015 a, b). Aunque la ICSI es una técnica que no requiere la selección específica de los gametos, se sigue utilizando en tratamientos para condiciones severas de infertilidad masculina. Se sabe que del 1 al 5% de los ciclos, ICSI falla y se considera que es debido a la deficiencia de la activación de ovocitos (DAO) (Amdani *et al*, 2015).

Esta técnica también ha sido utilizada en especies domesticas como el ratón (Sanusi *et al*, 2015), el ovino (Shirazi *et al*, 2018), el bovino (Suttirojpattana *et al*, 2016) y el porcino (Casillas *et al*, 2015 a). Se ha observado que los ovocitos de mamíferos difieren en su respuesta al procedimiento de ICSI dependiendo de la especie. Por ejemplo, en ratones (Sanusi *et al*, 2015), la inyección del espermatozoide en el citoplasma puede ser suficiente para la activación del ovocito y la descondensación de los espermatozoides, lo que da como resultado la formación del pronúcleo masculino y femenino. En caso contrario, en especies como el ovino o el bovino, el pretratamiento de los espermatozoides con compuestos como glutatión (GSH), heparina o ditiobutilamina (DTBA) aumentan la tasa de desarrollo de los pronúcleos, lo que puede mejorar las tasas de fertilización y DE (Suttirojpattana *et al*, 2016; Shirazi *et al*, 2018).

Debido a lo anterior ha sido importante realizar mejoras a las TRA para incrementar las tasas de fertilización y DE. Por lo que surgen nuevas técnicas de inyección por selección morfológica de espermatozoides (IMSI) e inyección por selección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides (PICSI) (Casillas *et al*, 2015). Esta última ha tenido gran auge considerándose como una alternativa a la técnica de

ICSI, por la selección de espermatozoides exponiéndolos previamente en una solución de ácido hialurónico (AH) (Parmegiani *et al*, 2010; Henkel *et al*, 2012). El AH que de manera natural se encuentra en el moco cervical del tracto reproductor femenino durante la ovulación, es importante para los ovocitos ya que también se encuentra y es sintetizado por las células del cúmulo, que son indispensables para la maduración y DE (Parmegiani *et al*, 2010; Appeltant *et al*, 2015, Casillas *et al*, 2015 a). La selección espermática por PICSÍ permite seleccionar un espermatozoide que ha tenido una adecuada maduración epididimaria, capacitación oviductal, integridad del ADN y capacidad enzimática para degradar al AH y ser capaz de fertilizar al ovocito (Casillas *et al*, 2015 b).

Aunque la implementación de las técnicas mencionadas anteriormente ha ido en aumento, es importante resaltar que la FIV sigue siendo un recurso indispensable en los laboratorios, ya que ésta no requiere de equipo costoso ni sofisticado, sino de la obtención de una muestra buena de ovocitos y espermatozoides para que éstos puedan interactuar en condiciones de laboratorio (Tanihara *et al*, 2013; Kitaji *et al*, 2015).

Con esta técnica se han obtenido altos porcentajes de éxito en diferentes especies de mamíferos. En la especie porcina, se presenta una alta tasa de FIV (81%); sin embargo, un alto porcentaje de ella es polispermica (42%) (Abeydeera *et al*, 2000), siendo esto uno de los principales obstáculos durante la FIV en porcinos. Se considera que una de las causas, es el empleo de un número excesivo de espermatozoides (100.000 espermatozoides/mm³, por 300-400 mL de eyaculado; con una dilución final

de la muestra para inseminar 10×10^5 espermatozoides/mL), condiciones subóptimas de la MIV y FIV, así como la penetración simultánea de los espermatozoides y el retraso de la reacción cortical de la ZP (Sano *et al*, 2010; Kitaji *et al*, 2015), por lo que se ha recurrido a la reducción de la concentración de espermatozoides usados durante la FIV, que efectivamente disminuye la polispermia pero, a su vez, ocasiona la disminución de las tasas de FIV, por lo que se puede considerar que la cantidad de espermatozoides capacitados en el sitio de la fertilización es importante para reducir la incidencia de polispermia en el porcino (Kitaji *et al*, 2015).

Debido a lo anterior, se han planteado alternativas para resolver esta problemática buscando la producción de embriones y blastocistos derivados de fertilización monospérmica; una de estas es la implementación de un método de FIV que implica la rotación constante de la dilución final de espermatozoides para la inseminación (simulación de las condiciones oviductales *in vivo*), otra es el uso de un clasificador espermático microfluídico (MFSS, por sus siglas en inglés) para aislar espermatozoides móviles mediante flujo laminar (sin centrifugación) (Sano *et al*, 2010; Tanihara *et al*, 2013; Kitaji *et al*, 2015).

1.6 Estructuras celulares: membrana plasmática, citoesqueleto y cromatina

Membrana plasmática

Debido a la función de los CPAs durante la vitrificación, es importante resaltar que

la estructura y composición de la membrana plasmática determina los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación.

La membrana plasmática es una bicapa fosfolipídica de estructura dinámica, que continuamente incorpora o retira componentes de su conformación (lípidos y proteínas), por ejemplo, durante la diferenciación celular y el ciclo celular. Con este último, la membrana duplica su tamaño antes de la división. Mide aproximadamente 10 nm de espesor. En las células eucariotas se compone principalmente de lípidos anfipáticos (compuestas por una parte hidrofílica y otra hidrofóbica), formados generalmente por 16, 18 o 20 carbonos de largo, alguno de ellos son los ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol y algunos de sus derivados (Cereijido *et al*, 2003).

La estructura de las colas de ácidos grasos de los fosfolípidos es importante para determinar la fluidez de la membrana. En condiciones normales, una mayor concentración de colesterol en la membrana ocasiona rigidez y reduce la permeabilidad. A temperaturas bajas, las colas rectas de los ácidos grasos saturados pueden unirse estrechamente produciendo una membrana densa y rígida, sin embargo, en estas condiciones el aumento de la concentración de colesterol favorece la fluidez de la membrana al evitar el empaquetado hermético (Reece *et al*, 2011).

Las membranas presentan proteínas que pueden unirse a otros componentes membranales y a proteínas del citoplasma, las cuales pueden anclarse a los microfilamentos (MF), microtúbulos (MT), filamentos intermedios (FI) o formar parte en la transducción de señales (Cereijido *et al*, 2003; Reece *et al*, 2011). Algunas

proteínas (desmosomas, uniones oclusoras y uniones comunicantes) pueden reconocer o unirse a componentes de la matriz extracelular, esto permite una asociación a células vecinas. La membrana plasmática presenta canales iónicos que, a nivel molecular, son proteínas que funcionan como poros que permiten el intercambio de iones y que, a nivel fisiológico celular, están involucrados en la división celular, el reconocimiento celular y el equilibrio electroquímico (Cereijido *et al*, 2003).

La membrana plasmática presenta, en menor proporción que los lípidos y las proteínas, carbohidratos que están presentes sólo en la superficie externa de la membrana plasmática, éstos están unidos a proteínas formando glicoproteínas o a lípidos formando glicolípidos. Las proporciones de proteínas, lípidos y carbohidratos en la membrana plasmática varían entre los diferentes tipos celulares y entre especies (Reece *et al*, 2011). En el porcino, con la técnica dual de espectroscopía de ionización-masa por electrospray de desorción (MS-DESI, por sus siglas en inglés), se observó un cambio dinámico en la composición de los triacilgliceroles, así como un aumento en el metabolismo de los ácidos grasos en la membrana durante la MIV de ovocitos (Pirro *et al*, 2014).

La membrana plasmática es la estructura que sufre mayor daño durante la vitrificación debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, disminuyendo su capacidad de expansión durante la rehidratación (Ávila-Portillo *et al*, 2006). Los ovocitos inmaduros porcinos presentan un mayor contenido lipídico en comparación con los ovocitos maduros y embriones, así como los de otras especies, esto ocasiona una baja permeabilidad de la membrana plasmática del ovocito a los CPAs, probablemente

ocasionado por la alta concentración de colesterol, lo que es un factor limitante para la criosupervivencia por lo que su vitrificación ha sido un reto (McEvoy *et al*, 2000; Somfai *et al*, 2012).

Citoesqueleto

Otra estructura importante encargada de mantener la integridad estructural y funcional del ovocito es el citoesqueleto. Es una estructura dinámica, la cual lleva a cabo modificaciones derivadas de la respuesta dada por la recepción de señales regulatorias. Está formado por un complejo de estructuras citoplásmicas constituidas por proteínas filamentosas presentes en la matriz citoplásmica de las células eucariotas: MF, MT, FI y una red microtrabecular (Benítez *et al*, 2003). La reorganización de esta estructura está involucrada, por ejemplo, en la comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo durante la maduración del ovocito, así como en la fertilización en mamíferos (Suzuky *et al*, 2000; 2002; 2003).

Microfilamentos. Son componentes constituidos por actina, la proteína citoesquelética más importante en la mayoría de las células. Tienen un diámetro de 5 a 7 nm y se encuentra localizado debajo de la membrana plasmática donde forman una red (figura 1). Existen dos formas de la actina, la G-actina y la F-actina. La primera tiene asociada una molécula de Ca^{2+} , que estabiliza su conformación globular, y una molécula de ATP (adenosin-trifosfato). El fosfato terminal se hidroliza convirtiendo la G-actina en F-actina (forma filamentosa) que forma parte de los MF. De manera *in vitro*, la polimerización de G-actina, presente en el citosol, se obtiene elevando las

concentraciones de sal en la solución (Benítez *et al*, 2003; Cooper y Hausman, 2007).

Los MF están unidos a proteínas moduladoras, las cuales regulan la polimerización y despolimerización. Los filamentos de actina se forman por la polimerización de la α - y β -actina. Esta última es la más frecuente y se presenta en la mayoría de las células animales.

Los MF interactúan con miosina y otras proteínas en el citoplasma y en la membrana plasmática, participan en procesos de movilidad celular y movimientos intracelulares. La miosina I está más relacionada al transporte. Los MF que interactúan con miosina II participan en el anillo contráctil que se forma durante la citocinesis (última etapa de la división celular), que es la contracción del citoplasma durante el proceso de división celular, se estrecha su diámetro progresivamente hasta la separación completa de los dos citoplasmas de las células hijas. Esta interacción está regulada por cambios en la conformación de la miosina y depende de la hidrólisis de ATP. En células no musculares, la activación de la miosina depende de los niveles de AMPc (adenosinmonofosfato cíclico) y por hormonas, a través de mecanismos de señalización que liberan Ca^{2+} de reservorios citoplasmáticos al citosol (Benítez *et al*, 2003).

El citoesqueleto de actina en los ovocitos de mamíferos es un sistema dinámico que dirige una serie de eventos durante la maduración y la fertilización, tales como el establecimiento de la polaridad de los ovocitos y el anclaje del eje, así como la orientación, la migración y el desarrollo pronuclear del embrión. La F-actina es importante en la distribución de algunos organelos como el complejo de Golgi, el

retículo endoplásmico liso y las mitocondrias, así como del posicionamiento espacial de mRNA (Bogliolo *et al*, 2015).

Microtúbulos. Son estructuras tubulares de 25 nm de diámetro constituidos por repeticiones de dímeros de α - y β -tubulina. Presentan una disposición radial partiendo desde el centrosoma (figura 1). Participan en el transporte intracelular, movimiento de cilios y flagelos, constituyen el huso para la segregación de cromosomas y el desplazamiento de centriolos durante la mitosis. Hace algunos años se identificó una tercera forma de tubulina γ que se encuentra asociada al centrómero. Los MT pueden ensamblarse y disgregarse dependiendo de la temperatura, presión, concentración de Ca^{2+} y pH (Benítez *et al*, 2003).

Para realizar la polimerización se asocian a proteínas como las MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos), Tau, dineína y cinesinas. *In vitro*, se requiere de la hidrólisis de GTP (guanósín trifosfato) de una concentración crítica del dímero de tubulina y de un centro organizador de microtúbulos (MTOCs; centrosoma) a partir del cual se realiza la polimerización. Para la inhibición de esta, se requiere de la presencia de Ca^{2+} . El extremo cercano al centrosoma, conocido como (-), crece más lento; el extremo distal o (+), crece de manera más rápida (Benítez *et al*, 2003; Cooper y Hausman, 2007).

Para la polimerización *in vitro* de MF y MT se requiere de su nucleación (arreglo de dos o más moléculas de actina o tubulina), que les confiera una conformación que

permita que otras moléculas se añadan y formen un polímero. Los MT y MF del citoesqueleto modulan el reordenamiento del retículo endoplásmico, regulando los canales iónicos, lo que ocasiona una mayor competencia en la generación de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular, fundamentales para la activación del ovocito (Coticchio *et al*, 2015 b; Amdani *et al*, 2015).

Filamentos intermedios. Son estructuras ancladas a complejos de unión de la membrana plasmática y también aparecen en el interior del núcleo (figura 1). Están conformados por una superfamilia de al menos 50 proteínas diferentes como queratina, vimentina, desmina, etc, con un diámetro de 8 a 10 nm, estos son los componentes más estables del citoesqueleto. Están clasificados en 6 grupos (I-VI) (Benítez *et al*, 2003; Cooper y Hausman, 2007).

Tienen un papel importante en la fisiología de la célula. Dan soporte a diversos componentes celulares, modifican la forma de las células y son elementos claves en la organización de la matriz citoplasmática. Además, son requeridos en diferentes etapas de la embriogénesis, en la organización nuclear, en la replicación del ADN, en el ensamble de la envoltura nuclear, para el transporte de colesterol, en la proliferación y migración celular (Benítez *et al*, 2003).

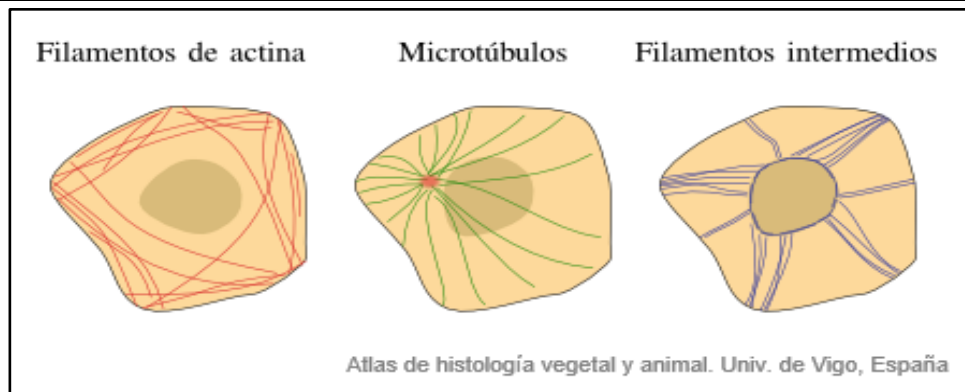


Figura 1. Distribución espacial de los componentes del citoesqueleto dentro de la célula animal (Tomado de Megías *et al*, 2017).

Cromatina

La cromatina (CR) está formada por ADN eucariótico y proteínas, principalmente histonas (proteínas básicas ricas en arginina y lisina), además de una variedad de proteínas cromosómicas diferentes a las histonas. Existen 5 tipos importantes de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4). La unidad básica estructural de la CR son los nucleosomas, estos complejos se repiten cada 200 pares de bases formando fibras de CR que están compuestas por cromatosomas separados por segmentos de enlace o *linker* de ADN, las cuales tienen una apariencia de collar de cuentas al microscopio electrónico, estas “cuentas” son llamadas partículas centrales o cores del nucleosoma (con 146 pares de bases) (Benítez *et al*, 2003; Cooper y Hausman, 2007).

La partícula central o core del nucleosoma consta de 146 pares de bases de ADN en 1.65 vueltas alrededor de un octámero de histonas (dos moléculas de H2A, H2B, H3 y H4). Un cromatosoma contiene dos vueltas completas de ADN (166 pares de bases)

sujetas por una histona H1 (figura 2a). El ADN rodea a las histonas en el core del nucleosoma y es sujetado por la histona H1. Las proteínas no histonas se unen al ADN de enlace entre el core para organizar la cromatina en nucleosomas (figura 2b), de esta manera, un conjunto de nucleosomas forma fibras de CR (Cooper y Hausman, 2007).

Morfológica y fisiológicamente se distinguen dos tipos de CR: la eucromatina, que tiene un aspecto claro y está poco condensada, suele corresponder a regiones del ADN que están transcribiéndose por lo que realiza una mayor expresión génica, se presenta mayormente en células en interfase. La heterocromatina, tiene un aspecto oscuro y está muy condensada, en su mayoría es transcripcionalmente inactiva, sólo alrededor del 10% de la CR en interfase es de este tipo, estando relacionada mayormente con células en mitosis. La heterocromatina a su vez se divide en facultativa (que en algún momento del ciclo celular también puede ser eucromatina), y en constitutiva, a la que se atribuye una función mayormente estructural (Cooper y Hausman, 2007).

Las configuraciones específicas de la CR son importantes para la reanudación meiótica y la competencia en el desarrollo del ovocito. La integridad genética y los cambios que ocurren en el compartimento citoplásmico tienen implicaciones importantes para la maduración y la calidad de los ovocitos. Los MF, MT y la CR interactúan en la segregación de cromosomas y en el establecimiento de la asimetría celular que permite la extrusión del cuerpo polar con una mínima pérdida de citoplasma (Coticchio *et al*, 2015 b).

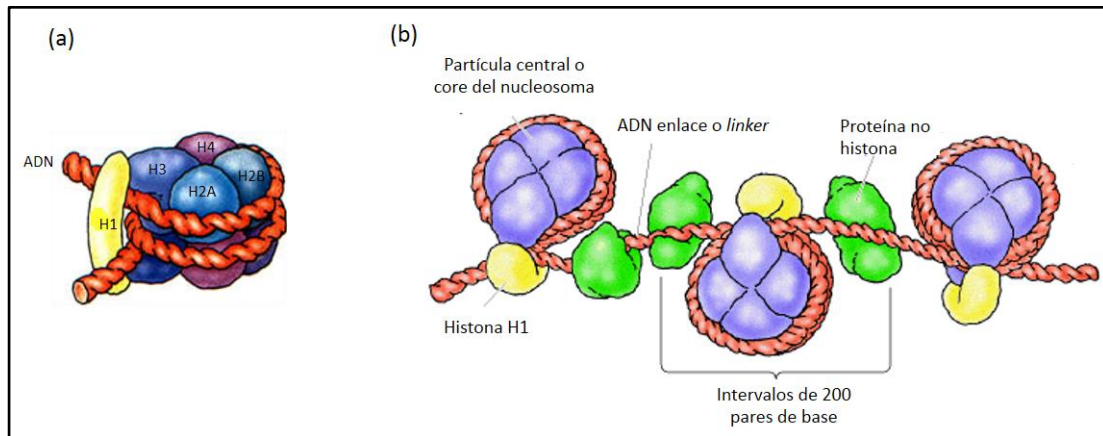


Figura 2. Conformación de la cromatina. (a) estructura del cromatosoma, (b) organización de la cromatina en nucleosomas (Tomado de Cooper y Hausman, 2007).

1.7 Meiosis y fecundación

Meiosis. En las células germinales se realiza la meiosis para la producción de gametos haploides (ovocito y espermatozoide), mediante la reducción del número de cromosomas a la mitad. Esta reducción se realiza mediante dos divisiones nucleares y celulares consecutivas (meiosis I y meiosis II), tras una única ronda de replicación del ADN (Benítez *et al*, 2003; Cooper y Hausman, 2007).

La primera división meiótica comienza al finalizar la interfase, durante ésta, los cromosomas homólogos se emparejan unos con otros y luego se segregan en células hijas con un único miembro de cada par cromosómico. La profase I se divide en cinco etapas: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. La asociación de los cromosomas homólogos (sinapsis) comienza durante el zigoteno. Durante esta etapa,

el complejo sinaptonémico se forma a lo largo de los cromosomas apareados, manteniendo a los cromosomas homólogos unidos en los lugares donde ocurrirá el entrecruzamiento durante el paquiteno (quiasmas). Este complejo desaparece en el diploteno y los cromosomas se separan. La diacinesis marca el final de la profase I, en la cual los cromosomas migran hacia la periferia del núcleo, desaparecen los quiasmas, se forma el huso y, finalmente, se desintegra la membrana nuclear. Esta etapa da paso a la migración de los cromosomas a la placa ecuatorial durante la metafase (Cooper y Hausman, 2007).

Después de la citocinesis se produce la segunda división meiótica, en la que, las cromátidas hermanas se separan dando como resultado cuatro células hijas haploides, con una única copia de cada cromosoma (Benítez *et al*, 2003; Cooper y Hausman, 2007).

En los ovocitos, el primer punto de regulación aparece en la etapa de diploteno de la meiosis I. Los ovocitos pueden permanecer detenidos en esta etapa durante largo tiempo (durante la vida fetal). En este periodo de crecimiento celular, los ovocitos acumulan gran cantidad de ARNs y proteínas, que se necesitarán en el desarrollo embrionario temprano. Los ovocitos reanudan la meiosis en respuesta a estimulación hormonal. La división celular de la meiosis I es asimétrica, generando un cuerpo polar pequeño y un ovocito de gran tamaño. La mayoría de los ovocitos de vertebrados se vuelven a detener en la metafase II, donde permanecen hasta la fecundación (figura 3a). La transición a la metafase I está controlada por el factor promotor de la maduración (FPM) por medio de estímulo hormonal de las gonadotrofinas. La detención de la

metafase II está dada por la regulación del factor citostático (FCS) formando el ovocito secundario (Cooper y Hausman, 2007).

Fecundación. Durante este proceso, el espermatozoide se une al receptor ZP3 (en el cerdo, compuesto por 71% de proteínas y 9% de carbohidratos en forma de glicoproteínas complejas) (Martin *et al*, 2017) de la superficie de la ZP e induce una serie de cambios en el citoplasma del ovocito fecundado, activando y completando su meiosis e iniciando los ciclos celulares mitóticos en el embrión temprano (Benítez *et al*, 2003; Cooper y Hausman, 2007).

Una señal de la unión del espermatozoide a su receptor en la membrana plasmática del ovocito es el aumento en el nivel de Ca^{2+} en el citoplasma de éste, lo que se puede deber a la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2). Esto desencadena la reacción cortical, mediante la exocitosis inducida por Ca^{2+} de vesículas secretoras presentes debajo de la membrana plasmática del ovocito, impidiendo la entrada de más de un espermatozoide, asegurando de esta manera la formación de un embrión diploide normal (Benítez *et al*, 2003; Cooper y Hausman, 2007).

Además, este aumento de Ca^{2+} citosólico tras la fecundación, también fungirá como señalización para que la segunda meiosis se complete, así como la inactivación del FPM, produciendo una citocinesis asimétrica, dando como resultado un segundo cuerpo polar. El núcleo del espermatozoide se descondensa, por lo que el óvulo fecundado (cigoto) contiene dos núcleos haploides (pronúcleos masculino y femenino). Dando lugar a la mitosis que resulta en dos células, cada una con un genoma diploide nuevo,

lo que da como resultado el desarrollo embrionario que dará origen a un nuevo organismo (figura 3b) (Cooper y Hausman, 2007).

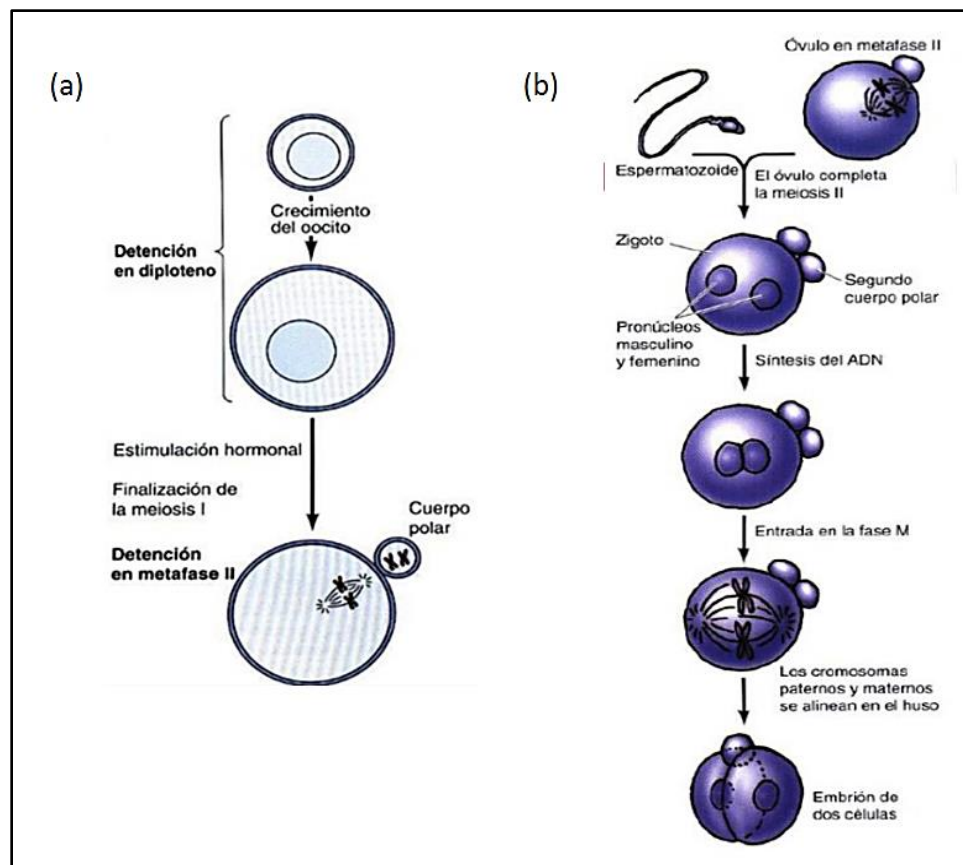


Figura 3. (a) Meiosis de los ovocitos en vertebrados. (b) Fecundación y finalización de la meiosis (Tomado de Cooper y Hausman, 2007).

II. ANTECEDENTES

Desde el surgimiento de la vitrificación en 1985 (Rall y Fahy, 1985), se han estudiado sus efectos en diferentes especies domésticas como el ratón (Somoskoi *et al*, 2015), el ovino (Bogliolo *et al*, 2015), el bovino (Chian *et al*, 2004), el porcino (Cuello *et al*, 2008;

Fernández-Reyes *et al*, 2012; Egerszegi *et al*, 2013; Casillas *et al*, 2014), entre otros; al igual que se han evaluado diferentes aspectos como la supervivencia (Chian *et al*, 2004), maduración (Fernández-Reyes *et al*, 2012; Casillas *et al*, 2014), fertilización (Egerszegi *et al*, 2013) y desarrollo embrionario (Cuello *et al*, 2008) y a distintos niveles estructurales como el citoesqueleto (Bogliolo *et al*, 2015), membrana plasmática (Bogliolo *et al*, 2015), cromatina (Somoskoi *et al*, 2015) y mitocondria (Somoskoi *et al*, 2015). Es importante señalar que, aunque ha aumentado el número de estudios relacionados con la vitrificación, particularmente en ovocitos porcinos, cada uno de estos estudios ha implementado diversos protocolos de vitrificación, esto debido a que el estado de desarrollo de la célula a vitrificar han sido diferentes, como vesícula germinal (VG) y MII (Cuello *et al*, 2008; Casillas *et al*, 2014). Algunas de estas diferencias entre protocolos es el uso de soportes diferentes al Cryolock y diversas concentraciones de CPAs, obteniendo bajas tasas de viabilidad, maduración y DE comparados con los obtenidos con el Cryolock y el empleo de DMSO y EG como CPAs (Shi *et al*, 2006; Casillas *et al*, 2014).

Aunque la vitrificación es una técnica muy utilizada para la preservación de gametos, en ovocitos porcinos en etapa de VG y en MII, se presentaron cambios ultraestructurales y del citoesqueleto, por lo que solo el 7.8% de los ovocitos en VG presentaron algún grado de desarrollo embrionario (solo 3 lograron desarrollarse hasta mórula), debido a que la inhibición de la polimerización de F-actina impide la finalización de la meiosis en ovocitos y el DE (Bogliolo *et al*, 2015). En bovinos, los ovocitos en MII expuestos a CPAs y vitrificados presentaron patrones anormales en la organización

de la F- actina del citoesqueleto (Bogliolo *et al*, 2015). Además, por medio de microscopía electrónica de transmisión (MET), se observó la separación de las células del cúmulo del complejo ovocito-células del cúmulo (COC) (Wu *et al*, 2006) y la fractura de la membrana plasmática (Zhou y Li, 2009) y de la zona pelúcida, además de la ruptura de las uniones comunicantes entre las células del cúmulo y la interrupción o desaparición de las microvellosidades, así como la presencia de gotas de lípidos no homogéneos rodeando grandes vacuolas (Wu *et al*, 2006; Zhou y Li, 2009).

Estudios en humanos mostraron que, el procedimiento disminuye el potencial de membrana interna en ovocitos en metafase II (MII) y produce la reorganización del citoesqueleto de actina sin presentar algún cambio significativo en la configuración del huso meiótico, además de que altera la función mitocondrial (Suzuki *et al*, 2003; Lei *et al*, 2014), así como la despolimerización de tubulina (Cubillos *et al*, 2011). La asociación entre los cromosomas y los microtúbulos durante la mitosis, además del recambio estructural de la actina sobre los componentes de la membrana plasmática, son imprescindibles para la maduración de los ovocitos (Sun *et al*, 2001).

La evaluación del huso en ovocitos por medio de microscopía confocal de láser de barrido (LSCM) mostró un alineamiento anormal de los cromosomas en la placa ecuatorial después de ser vitrificados (79.5% frescos vs. 10.1% VG vitrificados) (Wu *et al*, 2006). Otro estudio indicó que la etapa meiótica en la que se encuentren los ovocitos está relacionada con las diferencias de temperatura y el tiempo de la despolimerización y repolimerización del huso, por ejemplo, la telofase I (TI) presenta

menos despolimerización de los husos a temperatura ambiente, a 4 °C y después de la vitrificación, a comparación de aquellos que se encuentran en MI y MII (Gomes *et al*, 2012). Aunado a esto, el porcentaje de ovocitos en VG y MII con distribución normal de F-actina se reduce después de la vitrificación (72.3% frescos vs. 16.9 y 37.2%, respectivamente) lo que sugiere que el daño irreversible al citoesqueleto de ovocitos porcinos en VG y MII después de la vitrificación podría ser un factor importante que afecta la competencia durante el desarrollo (Wu *et al*, 2006).

La integridad de la membrana y del citoesqueleto del ovocito durante la fertilización es de gran importancia, ya que en ésta se encuentran receptores de acoplamiento para las proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide, sin los cuales el reconocimiento de los gametos no sería posible (Berger *et al*, 2011).

Se ha reportado que la exposición de los blastocistos porcinos a los CPAs disminuye las tasas de supervivencia, aún sin ser vitrificados. Se observó un aumento en la fragmentación del ADN en los núcleos de estos embriones (Rajaei *et al*, 2005), con lo que el daño citotóxico se puede adjudicar a la exposición de los CPAs. Esto se puede deber a que la citotoxicidad de estos agentes se presenta en mayor proporción en las células con una mayor actividad metabólica (Lawson *et al*, 2011). Al contrario de lo planteado por Rajaei y colaboradores (2005), se ha estudiado el efecto de la vitrificación en blastocistos humanos al quinto día de desarrollo, en el cual no se vio afectada la tasa de supervivencia de éstos, sin embargo, se consideró la clasificación del huso mitótico con base en su grado de daño en normal, anormal, multipolar y monopolar. Solo 4% de blastocistos frescos presentaron anormalidades, en

comparación de 22% de blastocistos vitrificados que presentaron alguna anomalía. Estas anomalías del huso mitótico están asociadas con el retraso cromosómico o fallo en la unión (Chatzimeletiou *et al*, 2012).

Uno de los daños más frecuentes causados por la vitrificación que se presenta en embriones y ovocitos es el daño por fractura, causado por el efecto mecánico de la solidificación de las soluciones, la temperatura crítica en el que se presenta este daño es entre -50 y -150 °C (Moussa *et al*, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

El progreso en la implementación de la vitrificación como método de criopreservación dentro de los procesos de reproducción asistida (de animales humanos y no humanos) ha avanzado a la par del surgimiento de nuevos estudios que proponen modificaciones e implementaciones en los diversos protocolos, la mayoría de los estudios están dirigidos a la evaluación de diferentes parámetros que pueden ser modificados como consecuencia del uso de esta técnica, como por ejemplo, las tasas de viabilidad, maduración, fertilización, desarrollo embrionario, etc., así como, la evaluación de daños ocasionados a nivel estructural (membrana plasmática, citoesqueleto, mitocondria, etc.) (Rajaei *et al*, 2005; Wu *et al*, 2006; Chatzimeletiou *et al*, 2012; Bogliolo *et al*, 2015).

Estos estudios han realizado las evaluaciones de manera directa en la misma etapa celular en la que se han vitrificado (Egerszegi *et al*, 2013), sin embargo, aún está poco claro si estos efectos producidos por la vitrificación seguirán presentes durante las

siguientes etapas de desarrollo de las células, por lo que es importante evaluar el efecto que la vitrificación de ovocitos en VG tendrá en el futuro DE temprano. Lo anterior puede aportar información para ayudar a explicar algunos posibles mecanismos afectados durante el proceso de vitrificación de estados celulares tempranos, que puedan comprometer la culminación de un DE. Además del aporte de conocimiento que pueda ayudar en un futuro a cubrir la necesidad de establecer protocolos de vitrificación que se adapten al tipo celular, así como, a las necesidades propias de cada especie y que, a su vez, ofrezcan más información sobre la calidad de la producción embrionaria.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la vitrificación de ovocitos en VG en la distribución de los MF y la CR durante el DE temprano?

V. HIPÓTESIS

Si la vitrificación de ovocitos en estado de VG causa alteraciones en la distribución de los MF y la CR, entonces, el DE temprano se verá afectado.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la vitrificación de ovocitos en estado de VG sobre la distribución de los MF y la CR en embriones para determinar su impacto en el DE temprano.

6.2 Objetivos particulares

- Determinar la viabilidad y la tasa de maduración *in vitro* de los ovocitos vitrificados en VG.
- Evaluar el efecto de la vitrificación en la fertilización por FIV y el DE.
- Determinar el efecto de la vitrificación en los MF y la CR de los embriones.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las muestras de ovarios se obtuvieron de cerdas prepúberes sacrificadas en el rastro, se transportaron al laboratorio en solución salina de NaCl 0.15 M a 25 °C. Después de la selección de los COCs, éstos se dividieron en dos grupos: a) control, ovocitos frescos en VG a los que se les realizó la MIV y que posteriormente fueron fertilizados mediante FIV y llevados hasta DE temprano (40 h), b) experimental, ovocitos vitrificados en VG a los que después del calentamiento se les realizó la MIV en cultivo con células del cúmulo y foliculares, así como la FIV y el DE temprano. En ambos grupos se evaluó la viabilidad por tinción con MTT, la maduración, fertilización y el DE por tinción de Hoechst. Se realizó el análisis de la presencia de MF (por inmunocitoquímica) y de CR (por tinción de Hoechst). Se realizó la prueba estadística χ^2 de Pearson, $P < 0.05$ para todas las comparaciones (figura 4).

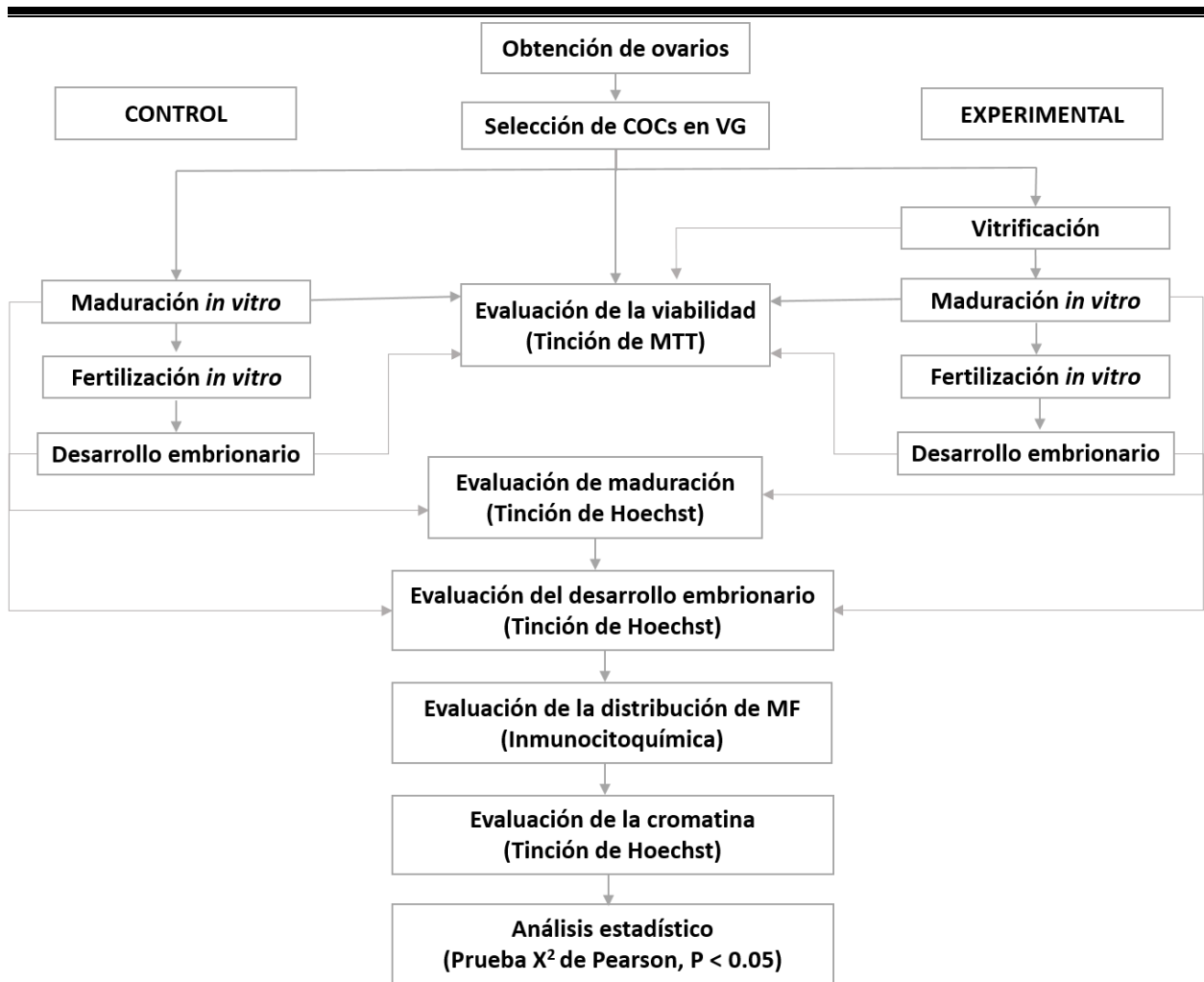


Figura 4. Diseño experimental.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

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

8.1 Selección de complejos ovocito-células del cúmulo (COCs)

Se seleccionaron los folículos ováricos con diámetro de 3 a 6 mm y fueron puncionados con una jeringa hipodérmica de 10 mL y una aguja hipodérmica de 18 x 38 mm. El líquido folicular se dejó sedimentar durante 20 minutos (min) para obtener el paquete celular y se realizaron dos lavados de 15 min cada uno con medio TL-HEPES-PVA 10 mM, suplementado con lactato de sodio 10 mM y 0.1% de alcohol polivinílico a pH de 7.3-7.4. Posteriormente se colocó la muestra en cajas Petri para realizar la colecta de los COCs bajo microscopio estereoscópico, se seleccionaron los ovocitos en VG con citoplasma uniforme y rodeados por al menos tres capas de células del cúmulo (Ducolomb *et al*, 2005).

8.2 Maduración *in vitro* (MIV)

Después de la colecta, se realizó un tren de lavado en tres cajas de Petri con 500 μ L de medio TCM-199 (In vitro, México) suplementado con cisteína al 0.57 mM y 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), cada uno, cubierto con aceite mineral. Después de los lavados, los COCs se transfirieron a una caja Petri de cuatro pozos (Nunc, Dinamarca) con el mismo medio anteriormente mencionado, se le adicionaron 5 μ L (0.5 μ g/mL) de hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) y 5 μ L (0.5 μ g/mL) de hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés), se incubaron a 38.5 °C con 5% de CO₂ y humedad a saturación durante 44 horas (h) (Ducolomb *et al*, 2005).

8.3 Vitrificación

En una caja Petri de cuatro pozos se agregaron 850 μ L de medio base (Holding Medium: HM por sus siglas en inglés) compuesto por medio TCM-199 suplementado con 0.2 M de L-glutamina, 0.59% de HEPES y 0.1% de PVA en los pozos 1 y 2; en el pozo 3 se agregaron 850 μ L de HM, 75 μ L de DMSO al 99.5% y 75 μ L de EG al 99% para el primer medio de vitrificación; finalmente, en el pozo 4, segundo medio de vitrificación, se añadieron 660 μ L de medio sacarosa 0.4 M (Sucrose Medium: SM por sus siglas en inglés), 20 μ L de HM, 160 μ L de DMSO y 160 μ L de EG. La caja se incubó mínimo por 2 h para equilibrar el pH (Casillas *et al*, 2014).

Se transfirieron de 6 a 8 ovocitos a los pozos 1 y 2 sin tiempo específico, posteriormente, se expusieron a la primera concentración de CPAs del pozo 3 durante 3 min. Durante ese tiempo, se formaron gotas de 10 μ L de medio del pozo 4 para coleccionar los ovocitos y ser transferidos al recipiente Cryolock, posterior a esto, se introdujo el Cryolock de manera horizontal a un recipiente con N_2L , la exposición de los ovocitos a esta última concentración de CPAs no fue mayor a 1 min, se almacenaron los Cryolock en N_2L durante 30 min (Sánchez-Osorio *et al*, 2010; Casillas *et al*, 2014).

8.4 Calentamiento

Después de retirar los Cryolock del N_2L se sumergieron verticalmente en una caja de cuatro pozos que contenía una única concentración de sacarosa al 0.4 M en medio TCM-199, los ovocitos se expusieron a esta concentración durante 5 min (Sánchez-

Osorio *et al*, 2010; Casillas *et al*, 2014). Los ovocitos se transfirieron a una caja de cuatro pozos con medio de MIV suplementado y con co-cultivo de 1×10^6 células de la granulosa fresca para la MIV (Casillas *et al*, 2014). La viabilidad de los ovocitos se evaluó inmediatamente después del calentamiento (0 h) y de la MIV (44 h).

8.5 Fertilización *in vitro* (FIV)

Después de la MIV, los ovocitos fueron desnudados por acción mecánica con ayuda de una micropipeta de 100 μ L. Los ovocitos se lavaron tres veces con medio TCM-199 y tres veces con medio amortiguado con Tris modificado (TBMm) en gotas de 500 μ L cubiertas con aceite mineral para retirar el exceso de células de la granulosa. Para la FIV, se colocaron de 40 a 60 ovocitos en gotas de 50 μ L de medio TBMm (medio de FIV) cubiertas con aceite mineral y se incubaron a 38.5 °C con 5% de CO₂ y humedad a saturación por 1h hasta la inseminación (Ducolomb *et al*, 2005).

La muestra de semen se obtuvo mediante el método de la mano enguantada, se hizo una dilución 1:10 con diluyente de semen de verraco (MR-A, Kubus, S.A., UE) y se transportó al laboratorio a una temperatura de 16 °C. Posteriormente, se diluyó 5 mL de muestra de semen en 5 mL de solución salina de fosfatos (PBS-Dulbecco. Gibco; dilución 1:1), suplementada con 0.1 % de albúmina sérica bovina (BSA) fracción V, 0.1 μ g/mL (0.01%) de penicilina potásica G y 0.08 μ g/mL (0.008%) de sulfato de estreptomicina. Se centrifugó a 61 X g durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se diluyó 1:1 con PBS-Dulbecco y se centrifugó a 1900 X g por 5 min. Se retiró el

sobrenadante hasta obtener únicamente el paquete celular, éste se resuspendió en 10 mL de PBS-Dulbecco y se centrifugó a 1900 X g por 5 min. Nuevamente se obtuvo el paquete celular y se resuspendió con 100 µL de TBMm. De esta última suspensión se tomaron 10 µL para realizar una dilución 1:1000 para el conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer. Para llevar a cabo la solución final de espermatozoides, se realizaron las diluciones pertinentes con medio TBMm para obtener una concentración final de 10×10^5 espermatozoides/mL.

Finalmente se agregaron 50 µL de la solución final de espermatozoides a las gotas del medio de FIV con los ovocitos. Las células se mantuvieron en co-incubación durante 6 h para la fertilización (Ducolomb *et al*, 2005).

Después del periodo de co-incubación, los ovocitos se lavaron tres veces en gotas de 50 µL de medio North Carolina State University-23 (NCSU-23) (Petters y Wells, 1993) suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0.4%; se colocaron en gotas de 500 µL del mismo medio cubiertas con aceite mineral en cajas de cuatro pozos y se incubaron a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación durante 16 h para la evaluación de pronúcleos y 40 h para la evaluación del DE temprano (Ducolomb *et al*, 2005).

8.6 Tinción de Hoechst e inmunocitoquímica (distribución de cromatina y microfilamentos)

Para la evaluación de la CR se realizó la tinción de Hoechst, la evaluación de los MF se realizó por ensayo de inmunofluorescencia con isotiocianato de faloidina- fluoresceína (FITC) conjugada (P5282; 1:350).

Después del periodo de incubación de DE temprano, los embriones se transfirieron 3 veces a gotas de 500 μ L de PBS-BSA para su lavado, todos los lavados se realizaron en las mismas condiciones. En una caja de cuatro pozos, se colocaron los embriones, se agregaron 300 μ L de Hoechst y se mantuvieron a 4 °C por 45 min, posteriormente fueron lavados. A éstos, se les agregaron 200 μ L de solución fijadora de paraformaldehído al 4 %, se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche para posteriormente ser lavados. Se añadieron a los embriones 200 μ L de solución permeabilizante de PBS-Tritón X-100 al 1 %, se mantuvieron a 4 °C por 2 h y se lavaron. Se agregaron 200 μ L de solución bloqueadora, con 0.02 g/mL de PBS-BSA, 0.02 g/mL de leche descremada y 0.011 g/mL de glicina diluidos en PBS, se mantuvieron por 1 h a temperatura ambiente, después de este tiempo se lavaron.

Para el marcado de MF, se agregaron 200 μ L del anticuerpo conjugado de FITC-faloidina y se mantuvieron a 4 °C por 2 h, posteriormente se transfirieron 3 veces a gotas de 500 μ L de PBS-BSA para su lavado.

El montaje se realizó con PBS/glicerol 9:1 en portaobjetos y fueron cubiertos con cubreobjeto para ser sellado con esmalte de uñas transparente. En cada tiempo de exposición con los anticuerpos respectivos, la caja que contenía los embriones fue cubierta con papel aluminio. Los lavados de los embriones consistieron en 3 lavados

con solución amortiguadora de PBS-BSA.

Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopio confocal láser de barrido. El análisis de la imagen confocal se realizó capturando una pila de serie Z, considerando cuatro secciones que abarcaban todo el embrión. Las imágenes se adquirieron secuencialmente mediante la línea de 488 nm de un láser de argón para FITC utilizado para la visualización de MF (en coloración verde) y un láser de argón-UV para DAPI para la visualización de la CR (en coloración azul). Se observaron a un aumento de 200X. La evaluación de las imágenes se realizó mediante el procesador de imagen, Image J (Abràmoff, 2004).

8.7 Evaluación de la viabilidad

La viabilidad se analizó con la tinción de MTT (Metil Tetrazolio). La evaluación se realizó al tiempo 0 (T0), en ovocitos en VG después de la colecta y después de la vitrificación; después de 44 h de la MIV (T44 MIV) y, finalmente, después de 40 h de DE temprano (T40 DE) en ambos grupos (Casas *et al*, 1999).

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron mediante una prueba estadística no paramétrica de comparación múltiple con respecto al grupo control de X^2 de Pearson con un nivel de confianza $P < 0.05$ con el paquete estadístico NCSS.

X. RESULTADOS

10.1 Evaluación de la viabilidad de ovocitos y embriones tempranos

En la figura 5 se muestra el criterio de evaluación de la viabilidad tanto de ovocitos como de embriones, las células que presentaron una coloración púrpura se consideraron como vivos y aquellos que carecían de dicha coloración fueron considerados como muertos.

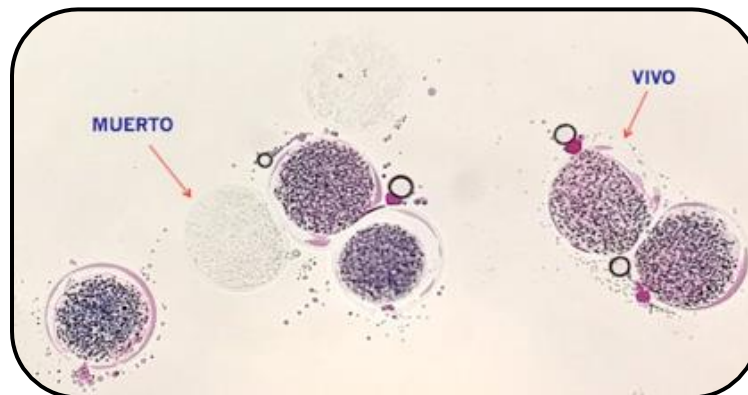
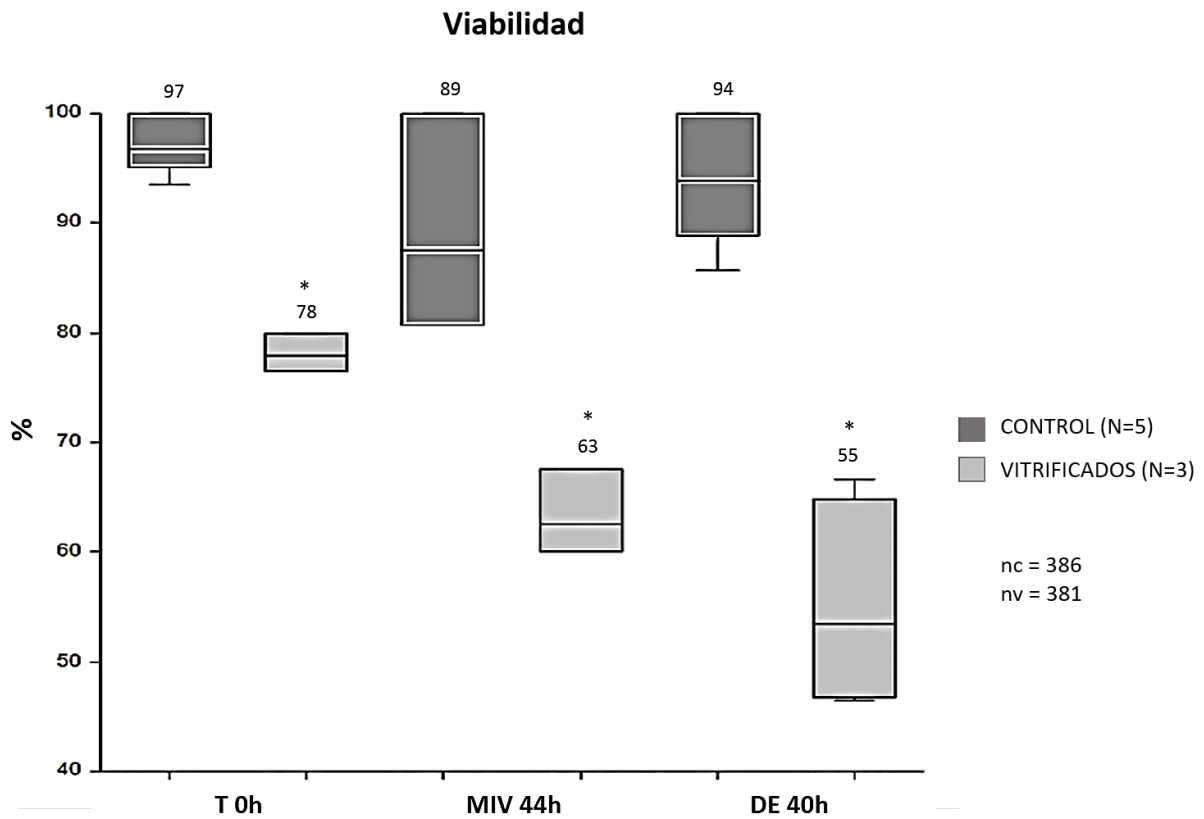


Figura 5. Criterios de evaluación de la viabilidad de ovocitos. Tinción de MTT.

Microscopía estereoscópica. 10X.

El 97% de los ovocitos en VG del grupo control estaban vivos después de la colecta (T 0h), este porcentaje se redujo en los ovocitos después de la vitrificación (78%). El porcentaje de viabilidad después de la maduración (MIV 44h) en el grupo control fue de 89%, nuevamente, se presentó un descenso en el porcentaje de ovocitos vivos en el grupo vitrificados, 63%. Finalmente, la evaluación se realizó en embriones tempranos (DE 40h), del total de ovocitos madurados, fertilizados y llevados a

desarrollo, se obtuvo un 94% de embriones vivos en el grupo control, comparado con los embriones del grupo vitrificado que descendió al 55% de viabilidad. Además, se presentó un descenso en la viabilidad conforme los tiempos de desarrollo iban avanzando. Los grupos vitrificados de cada tiempo evaluado presentaron diferencia significativa respecto al grupo control (figura 6).



* Diferencia significativa respecto al control. Prueba χ^2 de Pearson. $P < 0.05$.

Figura 6. Efecto de la vitrificación en la viabilidad. N= núm. de réplicas, nc= núm. de células evaluadas del grupo control, nv= núm. de células evaluadas del grupo vitrificados.

10.2 Evaluación de la maduración *in vitro* de ovocitos

En la figura 7 se presentan los criterios de evaluación de la MIV de los ovocitos, aquellos que presentaron VG fueron considerados inmaduros, en vías de maduración los que se encontraron en MI y madurados los que estaban en MII y presentaron el primer cuerpo polar.

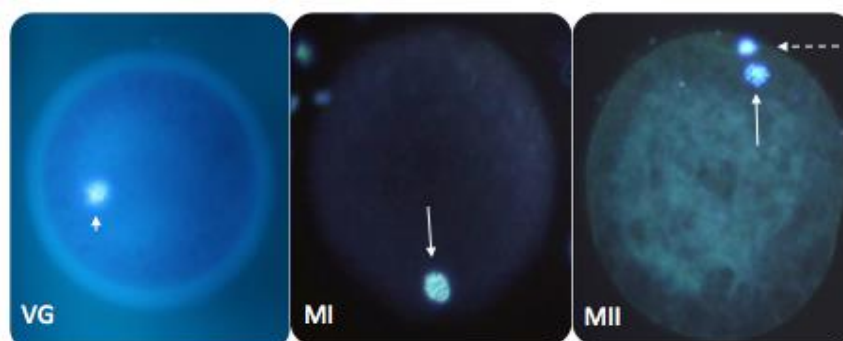


Figura 7. Criterios de evaluación de la maduración *in vitro* de ovocitos. (VG) vesícula germinal, (MI) metafase I, (MIII) metafase II. Cabeza de flecha: vesícula germinal, flechas continuas: metafases, flecha punteada: cuerpo polar.

Tinción de Hoechst. Microscopía de fluorescencia. 400X.

En la figura 8 se muestran los porcentajes de MIV de los ovocitos en ambos grupos. En el grupo control, se presentó un 79% de maduración. Se puede observar la disminución en el porcentaje de maduración de los ovocitos que fueron vitrificados (40%). El grupo vitrificados presentó un mayor porcentaje de ovocitos en VG comparado con el control (56% y 11%, respectivamente), caso contrario al de los ovocitos no vitrificados los cuales presentaron mayores porcentajes en estados de MI

y MII con respecto a los vitrificados (79% y 12% vs. 40% y 4%, respectivamente). Los grupos vitrificados en cada estado de maduración presentaron diferencia significativa respecto al grupo control.

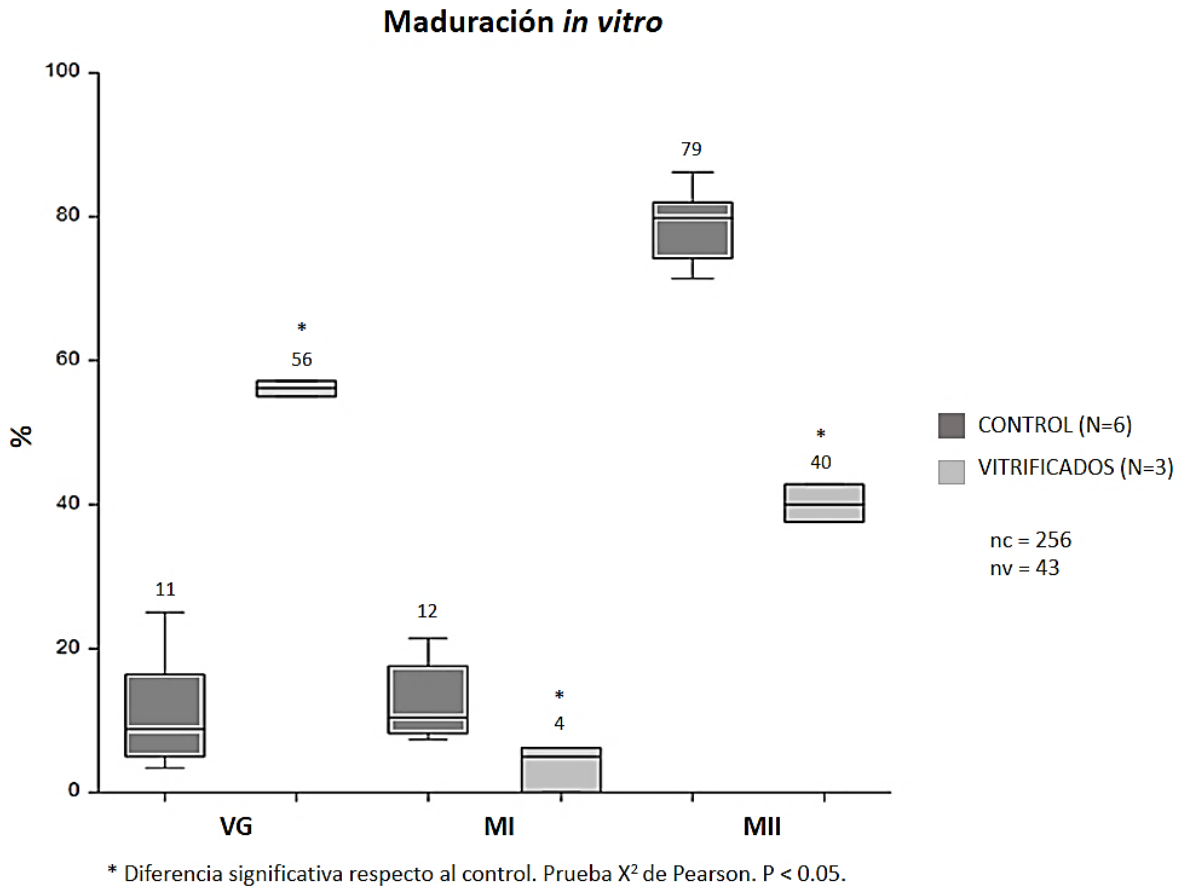


Figura 8. Efecto de la vitrificación en la maduración *in vitro*. N= núm. de réplicas, nc= núm. de células evaluadas del grupo control, nv= núm. de células evaluadas del grupo vitrificados.

10.3 Evaluación de la fertilización *in vitro*

La figura 9 muestra los criterios considerados para la evaluación de la FIV. Los ovocitos

con un solo pronúcleo se consideraron como activados (a), aquellos que presentaron dos pronúcleos uniformes fueron considerados como cigotos monospermicos (b) (fertilizados de buena calidad), con más de dos cabezas descondensadas de espermatozoides o un PN femenino y más de dos PN masculinos se consideraron como polispermicos (c) (fertilizados) y la presencia de metafases se consideró como ovocitos no fertilizado (d).

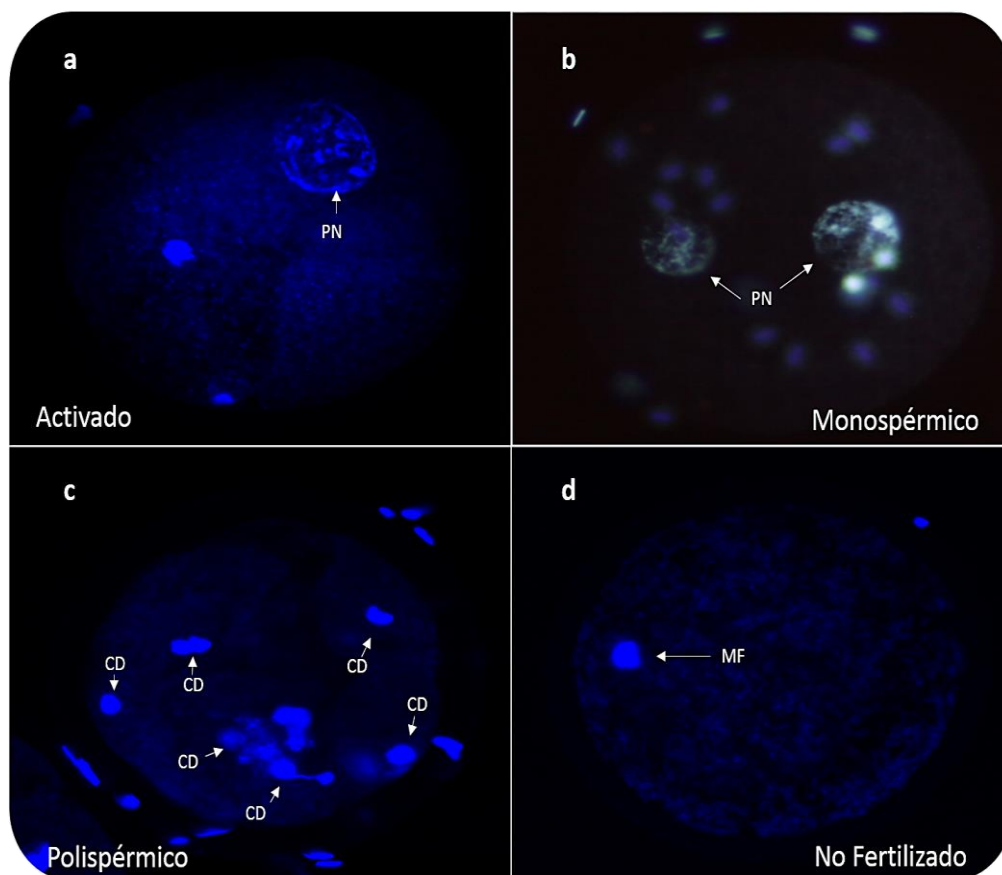


Figura 9. Criterio de evaluación de la FIV. (PN) pronúcleos, (CD) cabezas descondensadas, (MF) metafase. Flechas blancas: señalan los núcleos y/o cromatina. Tinción de Hoechst. Microscopía confocal láser de barrido. 200X.

El grupo de ovocitos vitrificados presentó un mayor número de ovocitos activados y no fertilizados comparados con el grupo control (42% vs 27%, 20% vs 13%, respectivamente), sin embargo, la fertilización polispérmica de ovocitos vitrificados fue menor que la del grupo control (8% vs 25%). La fertilización monospérmica, considerada como el mejor parámetro de fertilización, no tuvo diferencia significativa entre ambos grupos (figura 10).

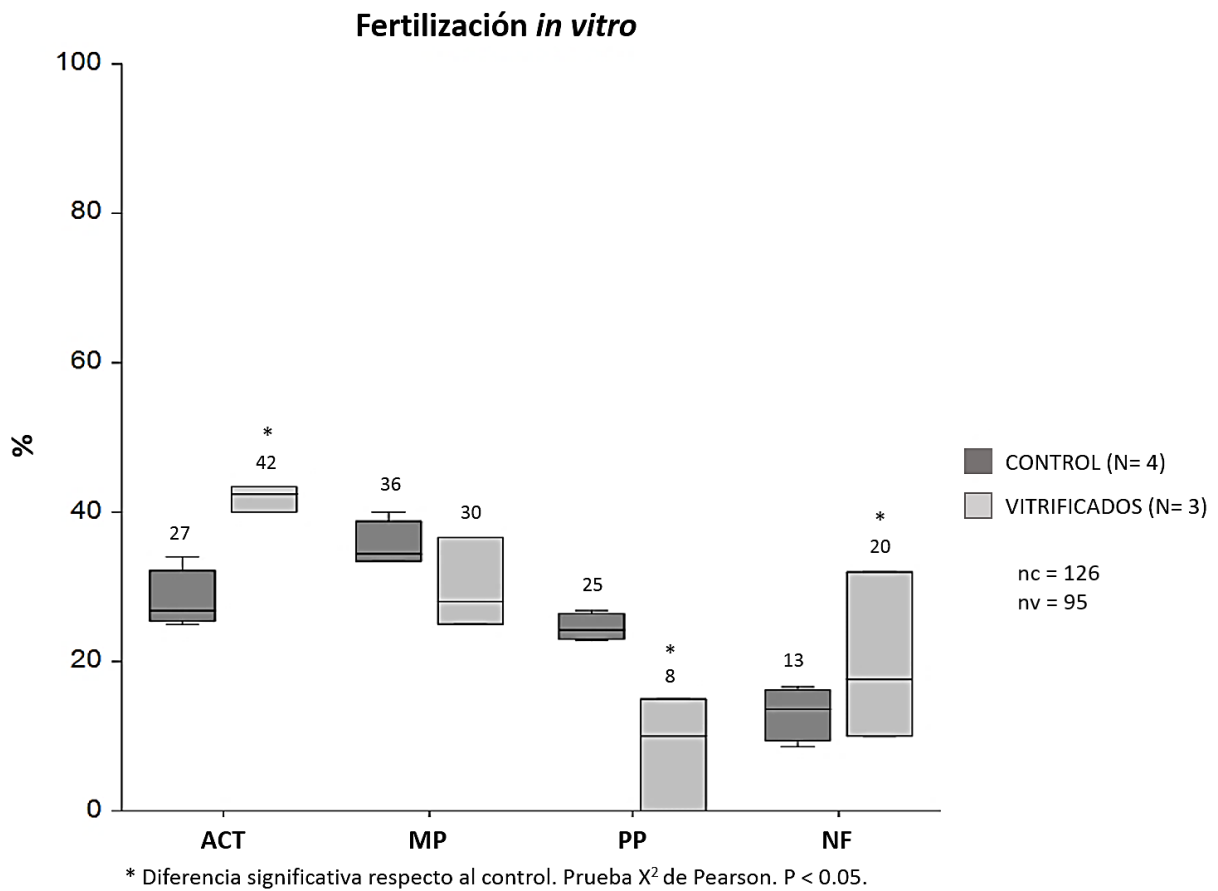


Figura 10. Efecto de la vitrificación en la fertilización *in vitro*. (ACT) Activados, (MP) Monospérmicos, (PP) Polispérmicos, (NF) No fertilizados. N= núm. de réplicas, nc= núm. de células evaluadas del grupo control, nv= núm. de células evaluadas del grupo vitrificados.

10.4 Evaluación del desarrollo embrionario

Para la evaluación del DE temprano (40 h) se consideraron embriones de 2-4 células y de 6-8 células, con núcleos bien definidos (figura 11).

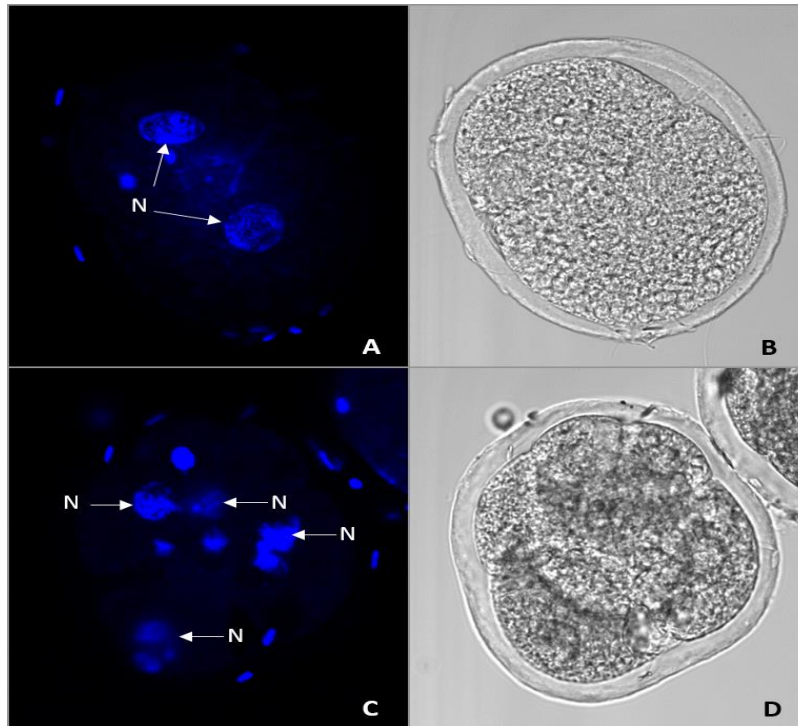


Figura 11. Criterio de evaluación del DE temprano (40 h). (N) núcleo. A y C: DAPI, B y D: campo claro mostrando los blastómeros. Tinción de Hoechst.

Microscopía confocal láser de barrido. 200X.

Los porcentajes de DE temprano a las 40 h en ambos grupos se muestran en la figura 12. En el grupo control, se presentó un mayor porcentaje de embriones de 2-4 células (58%). En el caso del grupo de ovocitos vitrificados el mayor porcentaje se presentó en células no divididas (63%), igualmente, hubo embriones con división de 2-4 células

(33%). En los embriones de 6-8 células, ambos grupos presentaron la menor proporción (9% y 4%, respectivamente), sin diferencia significativa respecto al grupo control.

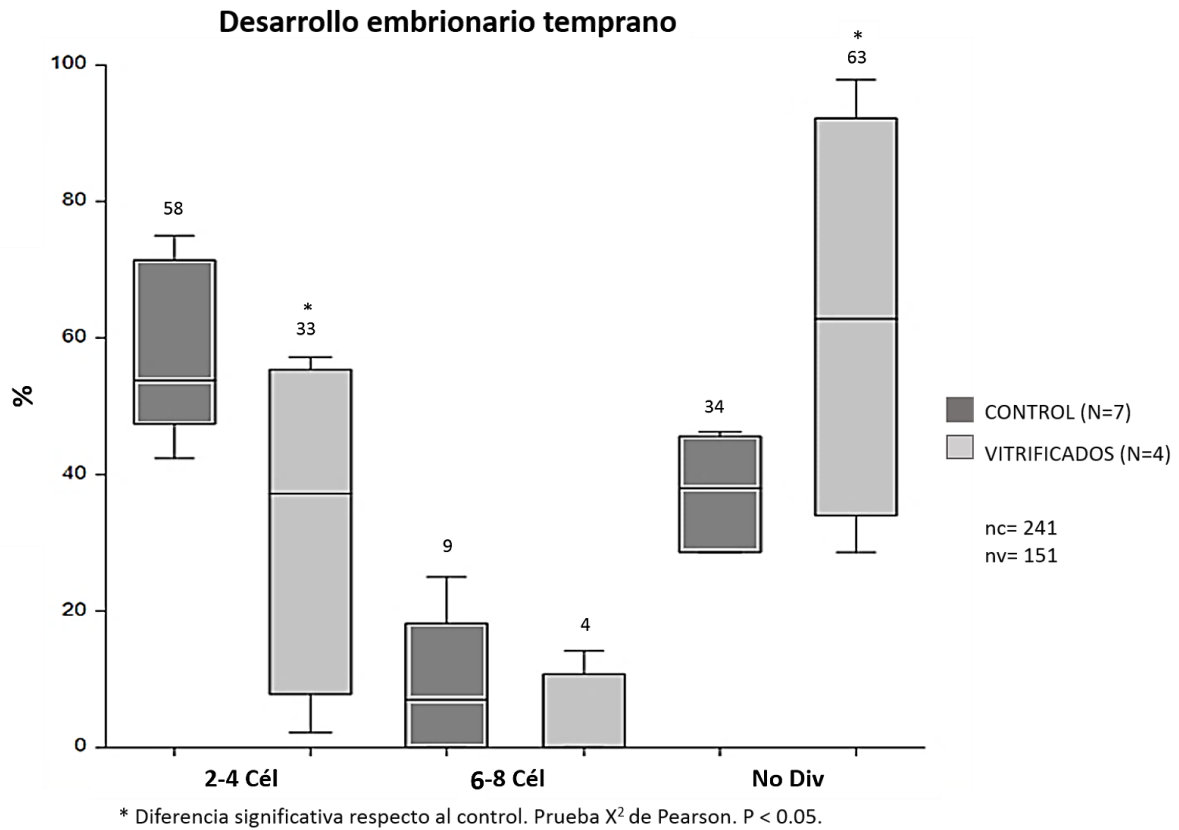


Figura 12. Efecto de la vitrificación en el desarrollo embrionario temprano. N= núm. de réplicas, **nc=** núm. de células evaluadas del grupo control, **nv=** núm. de células evaluadas del grupo vitrificados.

10.5 Evaluación de la distribución de microfilamentos en embriones tempranos tempranos

Se consideraron tres criterios de clasificación, embriones con actina cortical (AC), actina disgregada (AD) y actina cortical disgregada (ACD) (figuras 13 y 14).

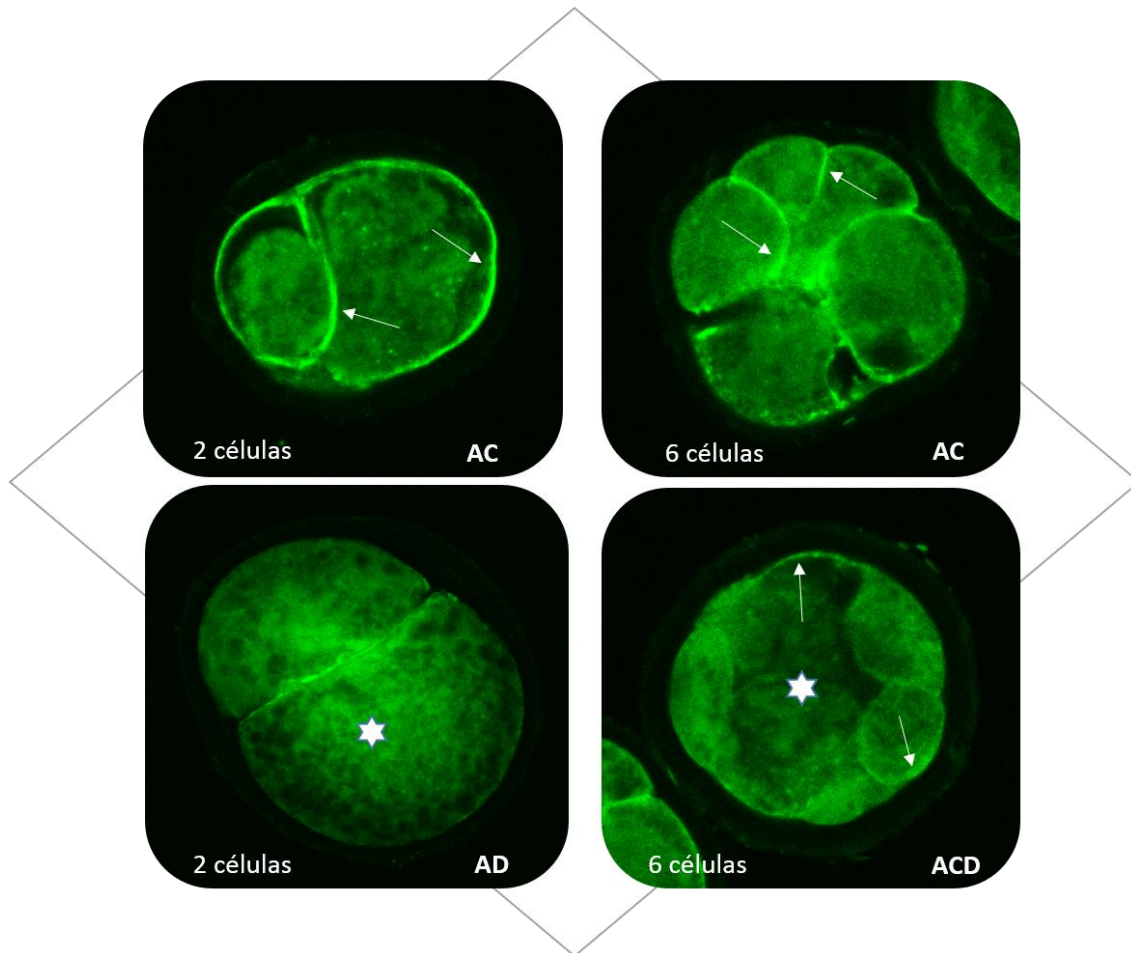


Figura 13. Evaluación de microfilamentos en embriones tempranos del grupo control. (AC) actina cortical, (AD) actina disgregada, (ACD) actina cortical disgregada. Flechas blancas: actina cortical, estrella blanca: actina disgregada. Tinción de FICT-faloidina. Microscopía confocal láser de barrido.

200X.

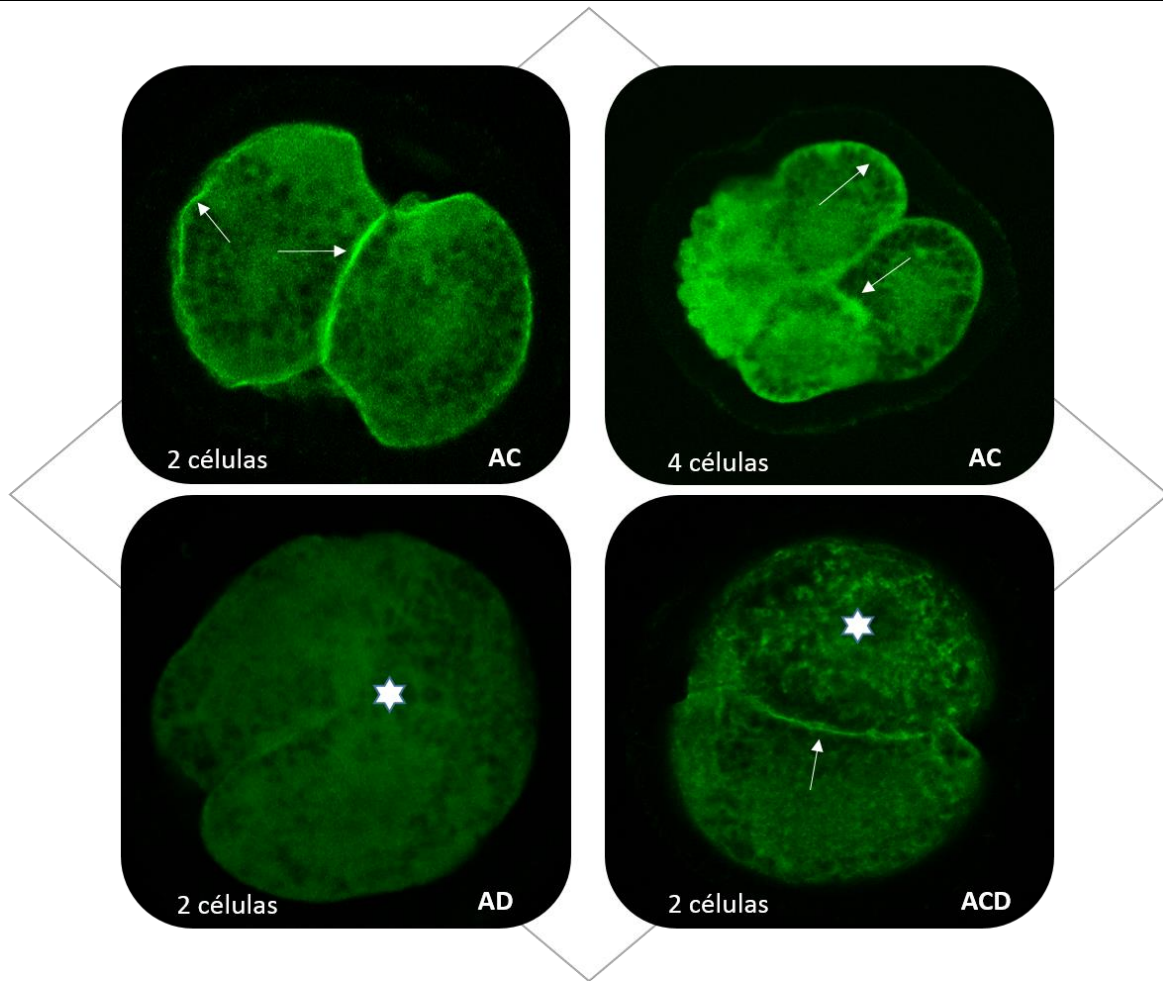


Figura 14. Evaluación de microfilamentos en embriones tempranos del grupo vitrificados. (AC) actina cortical, (AD) actina disgregada, (ACD) actina cortical disgregada. Flechas blancas: actina cortical, estrella blanca: actina disgregada. Tinción de FICT-faloidina. Microscopía confocal láser de barrido. 200X.

La presencia de AC en los embriones da la pauta para considerar a un embrión de buena calidad, que tiene una alta probabilidad de concluir favorablemente el DE; la ACD se relaciona con un embrión de calidad media, es decir, un embrión con probabilidad de concluir el desarrollo embrionario y la AD está relacionada con la baja

calidad embrionaria, con embriones con bajo o nulo potencial de culminar el desarrollo embrionario.

El grupo control presentó mayor porcentaje de embriones que mostraron AC, a diferencia del grupo de ovocitos vitrificados en el cual el mayor porcentaje de los embriones presentaron ACD (69% y 41%, respectivamente). Otro porcentaje de embriones control presentó ACD (23%) y el menor porcentaje de AD (8%). El menor porcentaje de los embriones que se desarrollaron a partir de ovocitos vitrificados presentaron AD seguido de la AC (31% y 28%, respectivamente). Los tres criterios de clasificación del grupo vitrificados fueron estadísticamente diferentes al grupo control (figura 15).

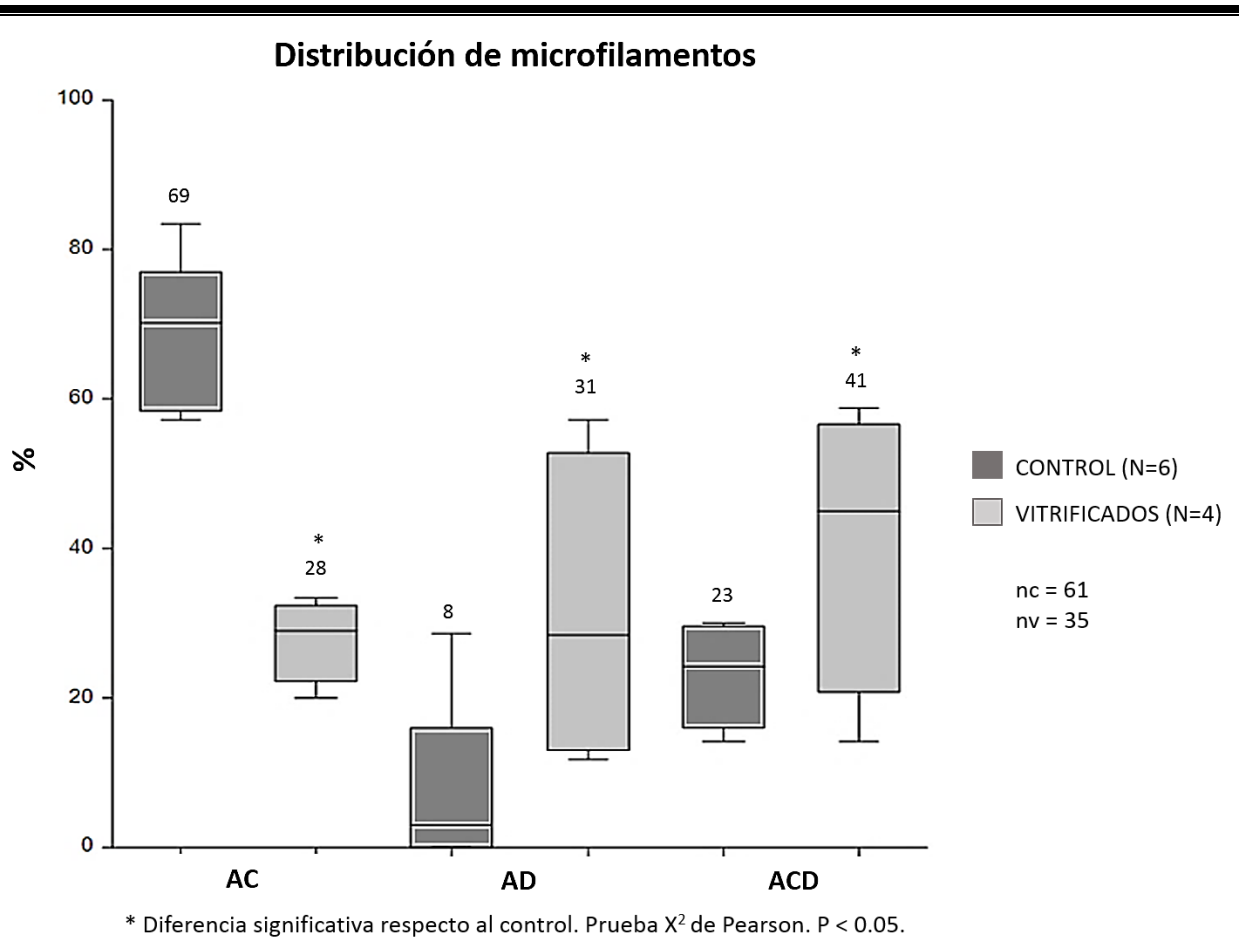


Figura 15. Efecto de la vitrificación en la distribución de microfilamentos en embriones tempranos. (AC) actina cortical, (AD) actina disgregada, (ACD) actina cortical disgregada. N= núm. de réplicas, nc= núm. de células evaluadas del grupo control, nv= núm. de células evaluadas del grupo de ovocitos vitrificados.

10.6 Evaluación de la distribución de cromatina en embriones tempranos

Para la evaluación de la CR en ambos grupos se consideraron dos clasificaciones, embriones sin daño (SD) y embriones con daño (CD) en la estructura de la CR. Los

embriones SD en la CR presentaron núcleos bien definidos y con el número de blastómeros correspondiente a su tiempo de división (figuras 16a, b y 17a, b), se consideraron embriones CD en la CR a aquellos que presentaron uno o más estructuras de cromatina anormal (CRA) (figuras 16c, d y 17c, d) y células sin división que presentaron estructuras de CRA (figura 17d). Los embriones SD en la CR están relacionados con embriones de buena calidad, con alta probabilidad de concluir satisfactoriamente el DE, los embriones CD en la CR tienen baja o nula posibilidad de concluir su desarrollo.

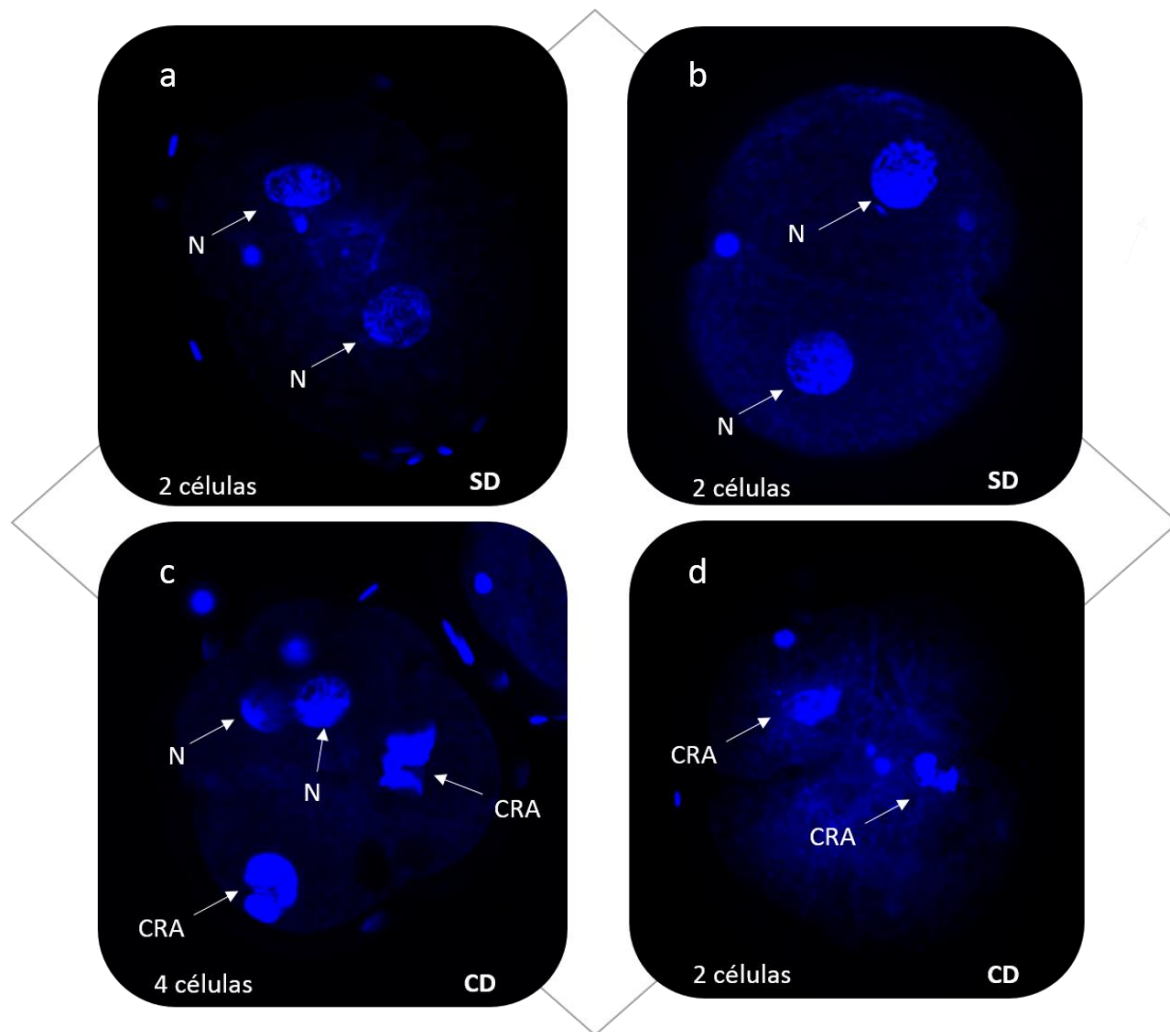


Figura 16. Evaluación de la cromatina en embriones tempranos del grupo control. (SD) sin daño, (CD) con daño. (N) núcleo, (CRA) cromatina anormal.

Tinción de Hoechst. Microscopía confocal láser de barrido. 200X.

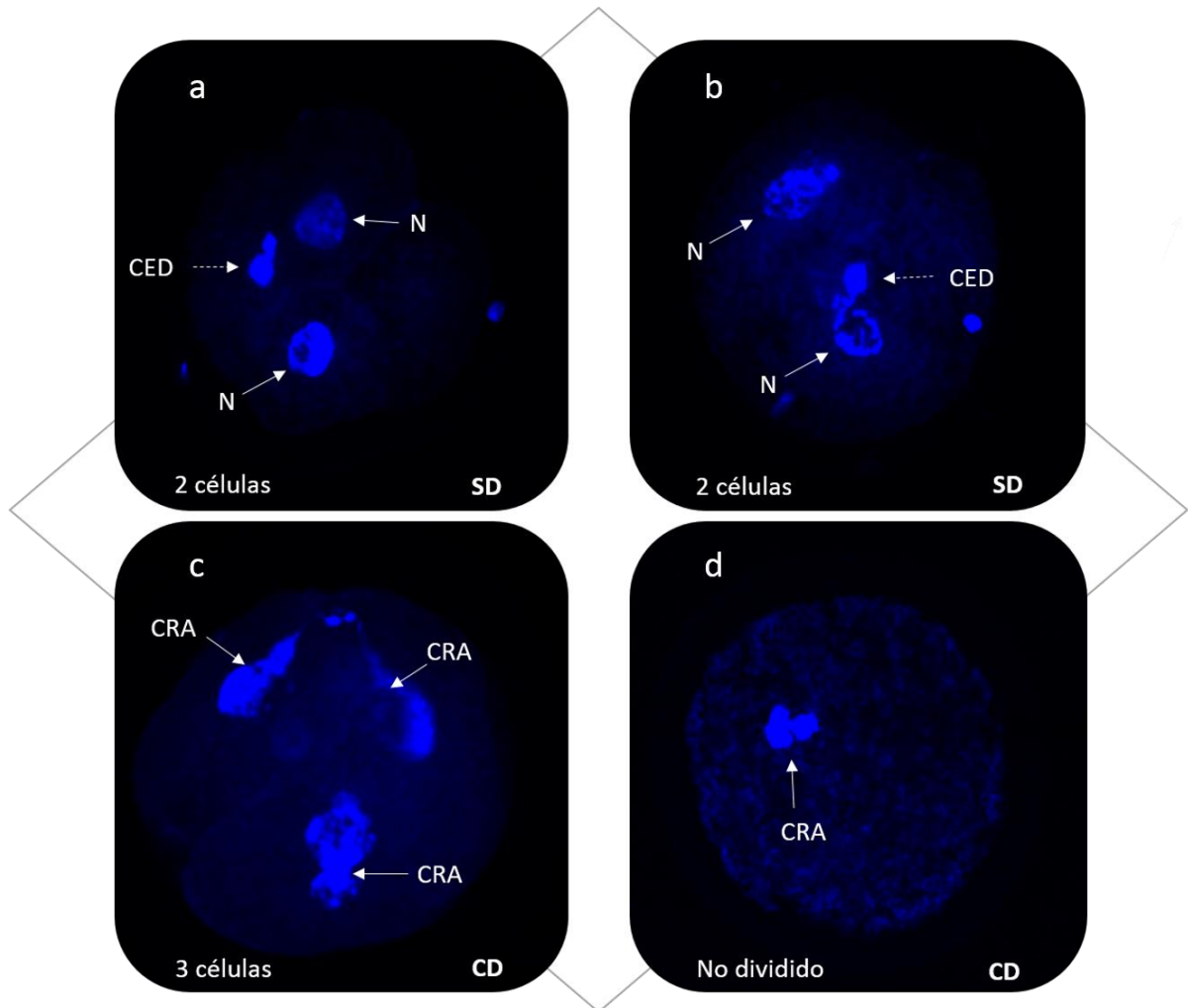


Figura 17. Evaluación de la cromatina en embriones tempranos del grupo vitrificados. (SD) sin daño, (CD) con daño. (N) núcleo, (CRA) cromatina anormal, (CED) cabeza de espermatozoide descondensada. Tinción de Hoechst.

Microscopía confocal láser de barrido. 200X.

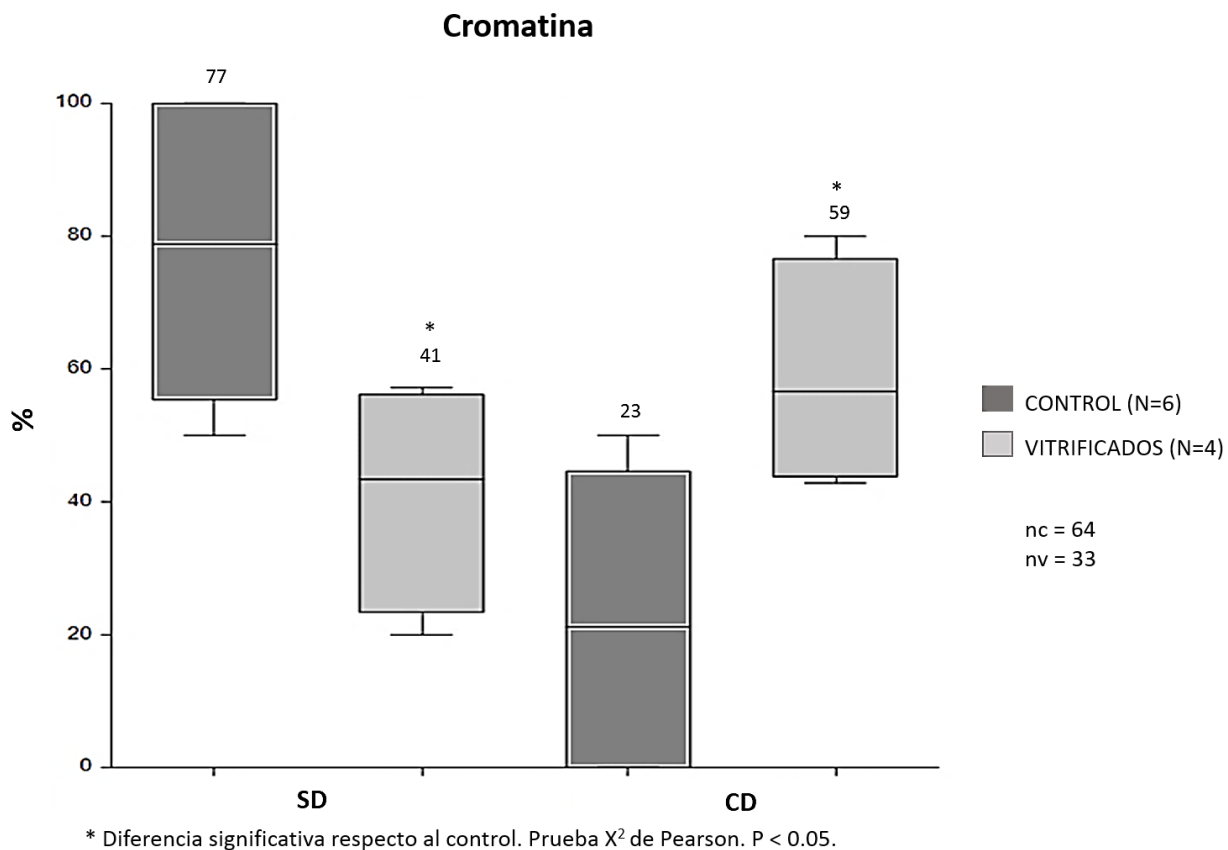


Figura 18. Efecto de la vitrificación en la cromatina en embriones tempranos. (SD) sin daño, (CD) con daño. N= núm. de réplicas, nc= núm. de células evaluadas del grupo control, nv= núm. de células evaluadas del grupo de ovocitos vitrificados.

El grupo control presentó mayor porcentaje de embriones con CR SD, con núcleos bien definidos. en contraste con el grupo de ovocitos vitrificados en el cual se presentó un mayor número de embriones con CR CD, es decir, con una o más estructuras de CR dispersa e incluso sin división embrionaria (77% y 59%, respectivamente). El grupo de ovocitos vitrificados fue estadísticamente diferente al grupo control en ambos casos (figura 18).

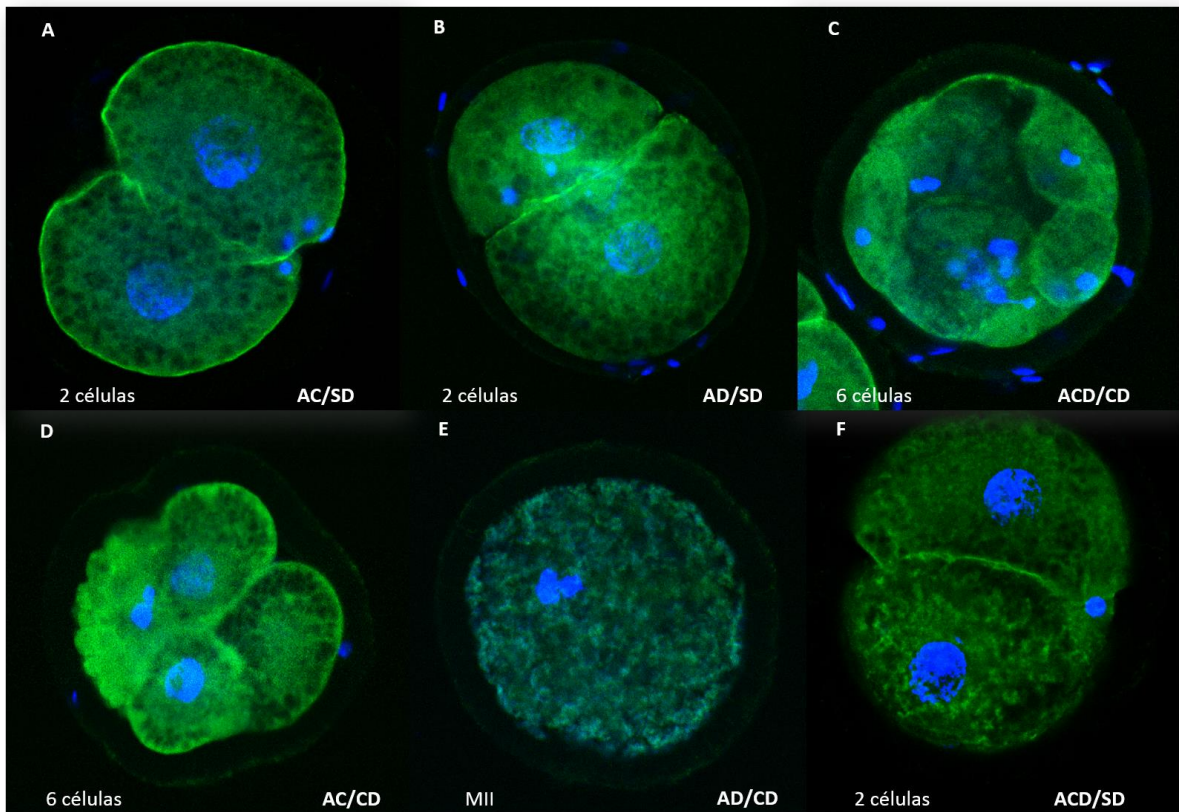


Figura 19. Superposición de las imágenes de los MF y la CR en embriones tempranos. A, B, C: grupo control. D, E, F: grupo de vitrificados. (AC/SD) actina cordical sin daño, (AD/SD) actina disgregada sin daño, (ACD/CD) actina cortical disgregada con daño, (AC/CD) actina cortical con daño, (AD/CD) actina disgregada con daño, (ACD/SD) actina cortical disgregada sin daño. En verde los MF, en azul CR. Microscopía confocal láser de barrido. 200X.

XI. DISCUSIÓN

Desde el surgimiento de la criopreservación, la implementación de la vitrificación para la conservación de gametos ha ido incrementando. El gameto masculino ha sido ampliamente estudiado por la facilidad de obtención y manipulación, sin embargo, en los últimos años se ha considerado al gameto femenino como modelo de estudio, debido al papel determinante que tiene en los procesos de la fertilización y del DE (Kopeika *et al*, 2015).

Debido a sus características celulares, el gameto femenino es más sensible a los efectos ocasionados por la vitrificación, por lo que han surgido diversas teorías que señalan que la formación de cristales de hielo intracelular, el volumen celular mínimo y la transición de fase de las membranas pueden ser los principales elementos responsables de la lesión criogénica (Kopeika *et al*, 2015).

La implementación de la vitrificación requiere del uso de CPAs a altas concentraciones y a un bajo volumen, los cuales tienen como finalidad la reducción de la formación de hielo intracelular y con ello la reducción de daño causado por rompimiento de estructuras celulares, mediante el aumento del grado de deshidratación celular y el cambio de la velocidad de enfriamiento y/o calentamiento. Estos agentes a altas concentraciones y exposición prolongada a temperatura ambiente presentan alta toxicidad, por lo que su uso incorrecto en protocolos de vitrificación puede tener un efecto citotóxico más que de agente crioprotector, reflejándose en defectos en la morfología, y hasta consecuencias

determinantes e irreversibles como la pérdida de la viabilidad. Además, el desplazamiento del agua del interior de la célula causado por la deshidratación puede ocasionar choque osmótico y un cambio perjudicial en el volumen celular. El calentamiento es una de las etapas más críticas durante la vitrificación, ya que rehidrata a la célula y elimina el crioprotector que ha permeado a la célula, por lo que, con el fin de evitar el choque osmótico, es importante la adecuada eliminación gradual del crioprotector (Kopeika *et al*, 2015).

La congelación y el calentamiento son procesos dinámicos que pueden tener impacto negativo en factores físicos como la presión osmótica, las fuerzas mecánicas de los cristales de hielo y el aumento de la presión hidrostática. Además, sobre factores químicos como la redistribución de los componentes iónicos, el cambio del pH, la transición de las proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, la transformación del estado redox, la formación de radicales libres y los efectos específicos y no específicos de la toxicidad de los CPAs (Kopeika *et al*, 2015; De Munck y Vajta, 2017).

Se han reportado múltiples protocolos de vitrificación, los cuales utilizan diversas combinaciones de CPAs a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, variados recipientes usados, en diferentes especies y estados nucleares. Por lo que es importante unificar los protocolos de vitrificación en cada especie, tipo y estado celular. Los CPAs más utilizados son el DMSO, EG, PROH, glicerol, sacarosa y trehalosa. Se sabe que el PROH y el DMSO son los CPAs permeables mayormente tóxicos y que el uso individual de cada uno aumenta el riesgo de daño, por lo que se ha sugerido la mezcla para reducir

la toxicidad (Cuello *et al*, 2008). Estudios realizados en el grupo de trabajo han indicado una optimización de la vitrificación empleando una mezcla de EG y DMSO a diferentes concentraciones como CPAs permeables y a la sacarosa como CPA impermeable (Casillas *et al*, 2014; 2015 a).

Viabilidad celular en diferentes tiempos de evaluación

Uno de los principales parámetros afectados por la vitrificación es la viabilidad. Resultados previos del grupo de trabajo (Casillas *et al*, 2014) presentaron mayor tasa de viabilidad de ovocitos en los grupos control y vitrificados al T 0h (100%, 90% vs 97% 78%, respectivamente) y del grupo control de MIV 44h (98% vs 89%) que los obtenidos en este trabajo, sin embargo, estos resultados no tienen diferencias representativas entre ambos estudios. Esto se puede deber a que las condiciones de trabajo fueron similares en ambos estudios, aunque es importante señalar que esto no excluye la presencia de variaciones que son propias del trabajo con sistemas biológicos. Por otro lado, el grupo vitrificados de MIV 44h presentaron la misma tasa de viabilidad en ambos estudios (63%).

No hay antecedentes que evalúen la viabilidad de embriones derivados de ovocitos vitrificados con las mismas condiciones de este trabajo, la mayoría de los estudios toman el porcentaje de DE para considerar el resultado de este parámetro (Rajaei *et al*, 2005; Maedomari *et al*, 2007; Somfai *et al*, 2010; Chatzimeletiou *et al*, 2012; Fernández-Reyes *et al*, 2012). En el presente estudio hubo un descenso en la viabilidad de los embriones

derivados de ovocitos vitrificados de casi la mitad comparado con lo obtenido en el grupo control (55% vs 94%; figura 6). El resultado obtenido en el grupo de ovocitos vitrificados es relevante, ya que indica que más de la mitad de los embriones evaluados estaban vivos. Esto se puede deber a que, conforme avanzó el estado de desarrollo celular y con ello el periodo de incubación, la viabilidad en el grupo de ovocitos vitrificados fue en descenso.

Dentro de las etapas de desarrollo celular, la de VG es muy sensible a la vitrificación. La alta cantidad de lípidos como fosfolípidos en la membrana plasmática y triglicéridos en el citoplasma, así como el recubrimiento por las células del cúmulo causan que los ovocitos en esta etapa tengan menor permeabilidad a los CPAs (Jin *et al*, 2012; Casillas *et al*, 2014; 2015 a). El contenido lipídico de la célula varía entre especies, presentando la especie porcina tasas altas de triglicéridos en comparación con otras, siendo esta condición uno de los motivos de la complejidad del cerdo como modelo de estudio, ya que esto reduce la permeabilidad celular a los CPAs. En esta misma especie, los ovocitos maduros (en MII) tienen mayor capacidad de supervivencia durante la criopreservación que los ovocitos inmaduros (en VG) (Somfai *et al*, 2012). Estos últimos son más sensibles al proceso de enfriamiento, por lo que hay una mayor tasa de supervivencia en aquellos ovocitos vitrificados en MII en comparación con los vitrificados en VG (Egerszegi *et al*, 2013). Sin embargo, se ha observado que los ovocitos en VG que sobreviven a la vitrificación recuperan su capacidad de desarrollo durante la MIV, posiblemente debido a la restauración de la competencia meiótica y a la recuperación de la habilidad para acumular GSH; esto sugiere la existencia de un mecanismo de recuperación durante la MIV, el cual, aún necesita ser esclarecido (Somfai *et al*, 2012).

Se menciona que la repercusión que este proceso pueda tener sobre la viabilidad se puede deber a los cambios estructurales que se presentan en la membrana de los ovocitos derivado del cambio de la temperatura de transición de la fase lipídica (Somfai *et al*, 2012).

Maduración in vitro de ovocitos inmaduros vitrificados

En el presente estudio se obtuvo un descenso en las tasas de MIV en el grupo de ovocitos vitrificados comparado con el grupo control (40% vs 79%; figura 8). Somfai y colaboradores (2010), reportan un 77% de MIV en el grupo control y 22% en ovocitos vitrificados mediante el método SSV (Solid Surface Vitrification). Estos datos muestran que la técnica de vitrificación implementada en nuestro estudio presenta mejores resultados para la MIV, además, de que la técnica de maduración establecida en el grupo de trabajo presenta tasas de maduración comparables con otros estudios realizados. Casillas y colaboradores (2014) y Fernández-Reyes y colaboradores (2012) reportaron tasas de MIV inferiores en los controles a lo obtenido en este estudio (70% y 61%, respectivamente), sin embargo, Casillas presenta un porcentaje mayor de MIV derivado de ovocitos vitrificados a lo que se obtuvo en este estudio (49% vs 40%). Así mismo, Egerszegi y colaboradores (2013) mencionan una tasa de MIV de ovocitos vitrificados muy similar a lo obtenido en su grupo control (75.5% vs 77.7%), sin embargo, el protocolo de MIV utilizado es diferente al implementado en este estudio (solución base de NCSU-37, suplementado con fluido folicular porcino), lo cual puede atribuirse a la recuperación de la competencia en la maduración.

Las células del cúmulo participan en la maduración nuclear de los ovocitos de mamífero. Durante la maduración, las células del cúmulo se expanden como resultado de las uniones comunicantes con el ovocito y, presumiblemente, debido a la producción de factores secretado por los ovocitos y viceversa. Se hace referencia a la relación de los niveles de glutatión (GSH) citoplásmico sintetizado por las células del cúmulo intactas con la eficiencia de la maduración de los ovocitos, la fertilización y el desarrollo embrionario, mediante la transferencia de este compuesto al citoplasma del ovocito (Maedomari *et al*, 2007).

Uno de los efectos ocasionados por la vitrificación es el desplazamiento de las mitocondrias y vesículas del área pericortical al citoplasma más profundo (se explica más adelante), esto puede comprometer la respuesta fisiológica de Ca^{2+} afectando la activación del ovocito, además, participa en la reacción cortical para bloquear el acceso de varios espermatozoides al ovocito e interviene en la activación del metabolismo de este y en la reanudación de la meiosis (Gualtieri *et al*, 2011; Egerszegi *et al*, 2013). Por otro lado, también se ha relacionado la disrupción de la reanudación meiótica con rompimientos de doble cadena del ADN en ovocitos inmaduros de humanos, con esto se enfatiza la importancia de la integridad del ADN para la correcta culminación de la maduración (Coticchio *et al*, 2015 a).

Fertilización in vitro derivado de ovocitos inmaduros vitrificados

Los elementos del citoesqueleto regulan varios eventos durante la fertilización en

ovocitos de mamíferos, como la penetración de los espermatozoides y la extrusión del segundo cuerpo polar. Egerszegi y colaboradores (2013) observaron que los cigotos derivados de ovocitos vitrificados en MII presentaban una capacidad reducida para extruir el segundo cuerpo polar comparado con los ovocitos vitrificados en VG, esto lo relacionan con la alta frecuencia de daño en los MT del huso y MF ocasionados por la vitrificación, además, de que se ven comprometidos por el poco tiempo que tienen para realizar la reparación del daño que puedan tener después de la vitrificación. Los ovocitos vitrificados en VG, presentaban una frecuencia de fertilización monospérmica similar a la del grupo control, ya que estos ovocitos tenían la capacidad de formar el pronúcleo masculino después de la penetración del espermatozoide. Esto coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, en el cual la tasa de fertilización monospérmica no presentó diferencias significativas entre el grupo control y vitrificados (36% vs 30%; figura 10), siendo el único parámetro que no se vio modificado por la vitrificación. Esto sugiere que nuestro protocolo de vitrificación no altera la competencia de los ovocitos porcinos para facilitar la penetración de los espermatozoides y lograr una fertilización monospérmica adecuada, aunque no reduce la polispermia.

Un efecto contrario se presentó en la activación, ya que hubo un aumento significativo en la tasa de activación en el grupo vitrificados comparado a los del grupo control (42% vs 27%; figura 10). Esta activación partenogénica ocurrida antes de la penetración de los espermatozoides puede estar causada por el procedimiento de vitrificación debido a la alteración o daño de los organelos que regulan el Ca^{2+} , las mitocondrias y el retículo endoplasmático. Esto puede deberse a dos procesos, por el choque osmótico causado por el cambio de temperatura y/o por la degeneración de los MF de actina cortical

(Gualtieri *et al*, 2011; Egerszegi *et al*, 2013).

La exocitosis de los gránulos corticales (GC) se desencadena fisiológicamente por elevaciones transitorias de Ca^{2+} en respuesta a la fusión del espermatozoide ocasionando el endurecimiento de la ZP. En ovocitos de ratón, el ProH, DMSO y EG causan elevaciones de la concentración de Ca^{2+} intracelular, así como endurecimiento de la ZP y, en ovocitos de humanos, el ProH y DMSO induce exocitosis por GC (Gualtieri *et al*, 2011). Por lo que es posible que el uso de diferentes CPAs y/o la baja temperatura pueda inducir microvacuolización, exocitosis de GC, hinchamiento de vesículas, daño mitocondrial y desplazamiento hacia el interior de organelos pericorticales, y dado que estos están involucrados en la generación de Ca^{2+} transitorio en la fertilización, se compromete la capacidad de los ovocitos criopreservados para elevar correctamente la concentración de Ca^{2+} intracelular, ocasionando un endurecimiento temprano de la ZP, que tiene como resultado la disminución de la polispermia (Egerszegi *et al*, 2013). Esto coincide con los resultados obtenidos, ya que se presentó una disminución significativa de polispermia en aquellos ovocitos que fueron vitrificados comparados con el grupo control (8% vs 25%; figura 10). Todos los organelos mencionados, desempeñan un papel clave en la concentración transitoria de Ca^{2+} intracelular durante la fertilización, que puede ejercer efectos a largo plazo en el DE pre y post implantacional (Gualtieri *et al*, 2011)

La etapa temprana del DE (desde 2 hasta 8 blastómeros) es considerada la etapa más crítica, ya que son células totipotenciales, ya que cuentan con el potencial para diferenciarse en células embrionarias o extraembrionarias, con capacidad para formar un nuevo organismo. Por lo que, de existir algún tipo de daño durante el desarrollo del ovocito, éste debe ser reparado para evitar la replicación y transmisión del defecto al nuevo organismo, o de lo contrario llevar a la muerte celular. La transmisión de defectos en el embrión tiende a la replicación, ya que el ciclo celular de embriones tempranos consiste en la alternancia de fases S y M con puntos de restricción, por lo que el daño al ADN se replica rápidamente. Se menciona que, de lograr el DE temprano pasar esta etapa, el embrión tiene más posibilidad de culminar su desarrollo hasta blastocisto (Martin *et al*, 2017).

A las 40 h posteriores a la fertilización se considera como DE temprano, en este tiempo se espera un mayor número de embriones con 2-4 blastómeros, sin embargo, un pequeño número de ellos puede presentar de 4-8 blastómeros. En los resultados presentados en la figura 12, se puede observar que el grupo control presentó una mayor tasa de embriones con divisiones de 2-4 células, comparado con el grupo vitrificados en el cual se presentó una disminución significativa de embriones en esta etapa (58% vs 33%, respectivamente). Algunos embriones mostraron de 6-8 blastómeros en ambos grupos, sin diferencia significativa entre ellos (9% y 4%), además, un alto porcentaje de ovocitos vitrificados no presentó división celular, lo que indica que la vitrificación de

ovocitos en VG afectó el desarrollo embrionario temprano.

Los resultados obtenidos fueron superiores a los reportados por Wu (2006) y Fernández-Reyes (2012), los cuales tuvieron tasas bajas de desarrollo embrionario temprano en porcinos en sus grupos control (53.3% y 25%, respectivamente) y, en vitrificados por Wu (2006) (8%). Somfai y colaboradores (2010), presentaron tasas similares de la primera división en los grupos vitrificados y control a los obtenidos en este estudio (34.4% y 69%, respectivamente). Es importante señalar que los estudios mencionados utilizaron protocolos de vitrificación y MIV diferentes a los utilizados en este estudio, como diferentes tipos y concentraciones de CPAs (PROH), diferentes recipientes (SOPS, Cryotop, BES) y diferentes métodos de vitrificación (superficie sólida), así como la adición de compuestos a los medios de MIV (como suero fetal bovino), a lo que se puede deber la diferencia en los resultados.

La señalización de Ca^{2+} en la activación de los ovocitos controla eventos tanto tempranos como tardíos del desarrollo embrionario como la excitosis de los GC, la reanudación del ciclo celular y la entrada a la primera división mitótica, además, el reclutamiento de ARNm materno, así como, la capacidad de los blastocistos para implantarse o desarrollarse después de la implantación (Gualtieri *et al*, 2011). La pausa del flujo de Ca^{2+} intracelular coincide con la activación del ciclo de reparación del ADN y con la regulación “río arriba” de maquinaria de protección, con lo que se aseguran las condiciones óptimas del cigoto para la embriogénesis (Martin *et al*, 2017). Como se mencionó, algunos CPAs (ProH, DMSO y EG) utilizados durante la vitrificación, causan

elevaciones de la concentración de Ca^{2+} intracelular, con lo que este ciclo de reparación de daño no se podría llevar a cabo, esto puede proporcionar una posible explicación de porqué el DE temprano de ovocitos vitrificados se ve comprometido. La disposición de la F-actina cortical determina la distribución de organelos implicados en las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular (como mitocondrias, retículo endoplásmico y GC), por lo que su disgregación, podría causar alteraciones en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular.

La culminación exitosa del DE hasta blastocisto depende de varias características del ovocito, tales como la competencia funcional del huso meiótico y otros elementos del citoesqueleto para asegurar el número normal de cromosomas en el cigoto. Además de los efectos ocasionados por la criolesión, la probabilidad de generar embriones normales a partir de ovocitos porcinos vitrificados se reduce aún más por su alta sensibilidad al estrés oxidante, común en los sistemas de producción embrionaria porcina debido a los periodos largos de incubación y a la manipulación (Egerszegi *et al*, 2013), además, del daño ocasionado a organelos como la mitocodria, clave en la regulación del estrés oxidante (Lei *et al*, 2014).

Distribución de microfilamentos en embriones tempranos derivados de ovocitos vitrificados

La actina es un componente esencial del citoesqueleto que cumple funciones como la migración y división celular y la regulación de la expresión génica, procesos fundamentales para el DE, además, los MT y MF reordenan a los organelos involucrados

en la fertilización, como en la extrusión del segundo cuerpo polar, al igual que en la reorganización del retículo endoplásmico liso para la generación de Ca^{2+} intracelular durante la activación del ovocito (Chankitisakul *et al*, 2010; Bunnell *et al*, 2011; Gualtieri *et al*, 2011; Egerszegi *et al*, 2013). Los MF están implicados en la inmovilización de las mitocondrias en la corteza celular o en sitios de alta utilización de ATP. Se ha reportado el desplazamiento de mitocondrias y vesículas del área pericortical al citoplasma más alejado de la superficie como consecuencia del desarreglo de MT y MF provocado por la vitrificación, lo que puede comprometer la respuesta fisiológica de Ca^{2+} (Gualtieri *et al*, 2011). Las funciones mencionadas se deben a la capacidad de la actina de polimerizarse y formar filamentos (F-actina) que pueden ensamblarse y desmontarse rápidamente de acuerdo con las necesidades de la célula (Benítez *et al*, 2003; Bunnell *et al*, 2011; Misu *et al*, 2017).

En los ovocitos maduros de mamíferos, la distribución cortical de la F-actina se encuentra polarizada, lo cual se evidencia por una protuberancia cerca del eje de la metafase (MII) y una señal menos intensa en el dominio cortical opuesto, además, se encuentra actina citoplasmática en ellos. En el caso de los ovocitos en VG, la actina cortical no aparece polarizada. Esto indica que, durante la maduración, la actina debe realizar una reestructuración para su polimerización (Coticchio *et al*, 2014; 2015 b). Hay estudios donde evaluaron el efecto de la vitrificación de ovocitos sobre el citoesqueleto, se observó una interrupción en la red de MF corticales, así como despolimerización y desorganización de los MT del huso, lo que llevó a la dispersión cromosómica; además, no se presentaron diferencias significativas entre los ovocitos que fueron expuestos únicamente a CPAs y aquellos que pasaron por todo el proceso de vitrificación, por lo

que el daño se adjudicó principalmente a los CPAs (Rojas *et al*, 2004; Chatzimeletiou *et al*, 2012).

Lo anterior da una pauta para explicar el posible mecanismo de daño derivado de la vitrificación de ovocitos en VG, los cuales presentaron diferencias significativamente mayores en el número de embriones tempranos con algún tipo de disgregación en la actina (AD o ACD) comparado con el grupo control (31% vs 8%, 41% vs 23%, respectivamente; figura 15), esto puede deberse a que la vitrificación impidió la polimerización correcta de la G-actina, la cual se vió reflejada en una disgregación de la actina en el citoplasma y/o la interrupción de la actina en la zona cortical. En el grupo de ovocitos vitrificados hubo una alta tasa de células no divididas, lo que está relacionado a la falta de mecanismos de reparación de daño en estos ovocitos. Los blastómeros que lograron alcanzar el DE temprano, un bajo porcentaje de ellos presentó actina cortical (distribución considerada en embriones de buena calidad; figura 14) comparada con el grupo control (28% vs 69%; figura 15), otro porcentaje de ellos tenían comprometida la polimerización de la actina (AD y ACD; figura 14).

La actina nuclear es aquella que está presente en los núcleos y está involucrada en una serie de procesos nucleares, incluida la regulación transcripcional y la remodelación de la cromatina. La polimerización de esta actina afecta la transcripción y tiene un papel importante en la activación de genes fuertemente silenciados en células somáticas para la reprogramación transcripcional, por lo que se considera que la actina nuclear también está implicada en el desarrollo embrionario (Baarlink *et al*, 2017; Misu *et al*, 2017).

Se ha descrito un aumento en la fragmentación del ADN en embriones que fueron vitrificados, esto se adjudicó como resultado de la exposición a los CPAs (Rajaei *et al*, 2005). Además, se menciona que la citotoxicidad de estos agentes se presenta en mayor proporción en las células que realizan una mayor actividad metabólica, como es el caso de los ovocitos en VG y embriones (Lawson *et al*, 2011). Se señala que los CPAs interrumpen la red de MF corticales, causando despolimerización y desorganización de los MT del huso, lo que lleva a la dispersión cromosómica que puede desencadenar aneuploidías en el DE (Rojas *et al*, 2004; Chatzimeletiou *et al*, 2012).

Se sabe que la criopreservación puede causar daño a las membranas, ocasionando el descenso del metabolismo celular y modificando los procesos bioenergéticos de la célula por daño mitocondrial. Sin embargo, no se conoce bien el efecto que este proceso pueda tener sobre la integridad funcional del material genético, en especial, en las células gaméticas (Albertini y Olsen, 2013; Kopeika *et al*, 2015). La fertilización y la capacidad de división celular después de la vitrificación pueden verse modificadas negativamente cuando el ADN, las nucleoproteínas (principalmente histonas) y el ADNm fueron afectados por este proceso (Kopeika *et al*, 2015).

El ADN es susceptible a una variedad de compuestos químicos y de agentes físicos que pueden causar alteraciones en su conformación, como consecuencia de errores producidos durante la replicación, la recombinación y la reparación. Varios factores

físicos y químicos que fluctúan durante el proceso de criopreservación tienen un efecto potencial sobre la estructura del ADN. Por ejemplo, el estrés hiperosmótico puede causarle daño o inhibir su reparación lo cual puede producir aberraciones cromosómicas. Las alteraciones celulares y moleculares asociadas a este tipo de estrés que son producidas durante los ciclos de deshidratación-rehidratación de ovocitos y/o por los CPAs, pueden afectar la arquitectura molecular del huso meiótico y de la CR. Esto puede deberse a la perturbación de la distribución y la funcionalidad de componentes citoplásmicos como los MT y los MF que interactúan con las mitocondrias. Además, los MF están implicados en la movilización de éstas hacia la corteza celular o a sitios de alta utilización de ATP. La despolimerización y desorganización de estos dos componentes del citoesqueleto impedirán la externalización del huso meiótico hacia la zona cortical y la alineación de los cromosomas sobre el eje ecuatorial (Gualtieri *et al*, 2011).

La inhibición de la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK) desempeña un papel central en el arresto del ciclo celular inducido por daño en el ADN y en su reparación. Los embriones tratados con inhibidores de CDK2 mostraron una escisión retrasada e inhibición en el desarrollo antes de la etapa de blastocisto (Wang y Kim, 2016).

Para que se realicen los procesos que requieren acceso al ADN, la estructura de la CR debe modificarse. Los principales objetivos en el proceso de remodelación son los nucleosomas. Estos cambios en la CR son el resultado de dos actividades: las enzimas modificadoras de histonas, que alteran las colas de histonas postraduccionalmente, y los complejos de remodelación de CR dependientes de ATP, que utilizan la energía para

cambiar los contactos ADN-histona e inducir deslizamiento o acumulación de ADN en los nucleosomas (Östlund Farrants, 2008). Los MF están implicados en la represión transcripcional, la replicación, la recombinación, la reparación del ADN y la inmovilización de las mitocondrias en la corteza celular y en sitios de alta utilización de ATP (Gualtieri *et al*, 2011). Sin embargo, una producción reducida de ATP en ovocitos humanos vitrificados se puede adjudicar a la despolimerización de MF, provocando falla en el sistema de reparación del ADN, llevando a desarreglos en la CR (Manipalviratn *et al*, 2011). Respecto al presente estudio, este mecanismo puede ayudar a entender el alto porcentaje de embriones derivados de ovocitos vitrificados que presentaron algún tipo de daño en la CR (CD; figura 17), el cual fue significativamente mayor a lo obtenido en el grupo control (59% vs 23%; figura 18). Caso contrario a los embriones de este último grupo, los cuales posiblemente presentaron un mecanismo íntegro en la maquinaria de reparación de daño al ADN, que se vio reflejado en una alta tasa de estos sin algún tipo de daño en la CR (SD) comparado a los del grupo vitrificados (77% vs 41%; figura 18), ésto puede estar ligado a la integridad de la AC y a las altas tasas de DE temprano. Debido a lo mencionado anteriormente, los mecanismos sugeridos son resultado de la acción coordinada de todas las estructuras evaluadas en este estudio, por lo que, el reflejo del efecto de una estructura no puede ser desligada del funcionamiento de la otra, ya que forman parte de la misma maquinaria celular.

Es importante señalar que los estudios reportados en la literatura, mencionados anteriormente, han realizado la evaluación del efecto de la vitrificación en ovocitos en VG y MII, cigotos y blastocistos en la misma etapa de desarrollo en la que se han vitrificado, además, los estudios de vitrificación en cigotos o blastocistos miden el papel

de los MF, MT y CR en cuanto al éxito que se tenga en la fertilización y en la producción embrionaria, y no en la distribución de estas estructuras en el DE temprano (Rojas *et al*, 2004; Wu *et al*, 2006; Somfai *et al*, 2010; Egerszegi *et al*, 2013; Wan-Hafizah *et al*, 2015). Por lo que, aun es necesario ampliar los conocimientos en cuanto a los posibles efectos de la vitrificación en etapas tempranas y la progresión que estos tendrán a largo plazo. Ya que es posible que los parámetros morfométricos del citoesqueleto y la CR puedan ser utilizados como biomarcadores de la calidad de los embriones tempranos.

XII. CONCLUSIÓN

La vitrificación de ovocitos porcinos en etapa de VG causó una disminución en las tasas de viabilidad celular, de la MIV y del DE temprano. Sin embargo, la fertilización monospermica no se alteró, siendo el único parámetro que no se vio afectado por la vitrificación.

La vitrificación también afectó la distribución de la AC en embriones de desarrollo temprano, por lo que, en términos de la distribución de esta estructura, se obtuvo un menor número de embriones considerados de buena calidad con posibilidad de llegar al término de su desarrollo. Además, el daño de la distribución de la AC influyó en el desarreglo en la compactación de la CR en los embriones causando el retraso o supresión del desarrollo de estos, ya que aquellos que se vieron afectados no lograron superar el daño para continuar con el desarrollo. Sin embargo, se requieren más estudios que evalúen el efecto de la vitrificación de ovocitos en VG sobre los MT de embriones tempranos.

XIII. PERSPECTIVAS

- Evaluar la viabilidad celular en la FIV (16 h) para analizar la correlación entre el descenso de la viabilidad con la etapa de desarrollo celular y el tiempo de incubación.
- Evaluar el efecto de la vitrificación de ovocitos en VG sobre los MT en embriones de desarrollo temprano, para determinar si existe una relación entre la distribución de los MT con el estado de la CR y de los MF. Además de evaluar el efecto de los MT con la calidad del DE.
- Implementar el uso de marcadores que revelen la presencia de roturas de ADN de doble cadena y de la activación de una respuesta de reparación del ADN (γ H2AX y Rad51, respectivamente), para abundar sobre el tipo de daño ocurrido en el ADN.

XIV. REFERENCIAS

1. 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 médium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*. 54: 787-797.
2. Abràmoff, MD. (2004). Image processing with Image J. *Biophotonics International*. S/V: 1-7.
3. Albertini, DF. Olsen, R. (2013). Effects of fertility preservation on oocyte genomic integrity. En *Oocyte Biology in Fertility Preservaion*. Springer-Verlag, N.Y. Capítulo 4.
4. Amdani, SN. Yeste, M. Jones, C. Coward. K. (2015). Sperm factors and oocyte activation: current controversies and considerations. *Biology of Reproduction*. 93:50, 1- 8.
5. Appeltant, R. Somfai, T. Nakai, M. Bodó, S. Maes, D. Kikuchi, K. Van Soom, A. (2015). Interactions between oocytes and cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes in a chemically defined medium: Effect of denuded oocytes on cumulus expansion and oocyte maturation. *Theriogenology*. 83: 567-576.
6. Ávila-Portillo, L. Madero, J. López, C. León, M. Acosta, L. Gómez, C. Delgado,
7. Baarlink, C. Plessner, M. Sherrard, M. Morita, K. Misu, S. Virant, D. Kleinschnitz, EM. Harniman, R. Alibhai, D. Baumeister, S. Miyamoto, K. Endesfelder, U. Kaidi, A. Grosse, R. (2017). A transient pool of nuclear F-actin at mitotic exit controls chromatin organization. *Nature Cell Biology*. 19: 1389-

1399.

8. Bajo, J.M. (2009). Fundamentos de reproducción. Editorial medica panamericana. Madrid, España. 269-280.
9. Benítez, G. González, A. Meza, I. (2003). El citoesqueleto. En *Biología celular y molecular*, 1º ed. Pearson Educación de México. 273-292.
10. Berger, T. Nitta, B.J. Ducolomb, Y. Betancourt, M. (2011). Interaction of potential porcine sperm ligands with the oocyte plasma membrane. *Reproduction in Domestic Animals*. 46: 15-20.
11. Bogliolo, L. Murrone, O. Piccinini, M. (2015). Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 32:185-193.
12. Borini, A. Coticchio, G. (2009). Preservation of human oocytes. En *Cryobiology science to clinical applications*. Editorial Infroma Healthcare. Londres, UK. 12-13.
13. Bunnell, T.M. Burbach, B.J. Shimizu, Y. Ervasti, J.M. (2011). β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular Biology of the Cell*. 22: 4047-4058.
14. 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.
15. Casillas, F. Ducolomb, Y. Lemus, A.E. Cuello, C. Betancourt, M. (2015). Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm

-
- injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell co-culture system. *Cryobiology*. 71: 299-305. (a)
16. Casillas, F. Retana-Márquez, S. Ducolomb, Y. Betancourt, M. (2015). New Trends in Assisted Reproduction Techniques: Cryopreservation, *In vitro* Fertilization, Intracytoplasmic Sperm Injection and Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection. *Journal of Anatomy and Physiology*. 5:184. (b)
17. Casillas, F. Teteltitla-Silvestre, M. Ducolomb, Y. Lemus, A.E. 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.
18. Cereijido, M. Contreras, RG. Shoshani, L. Ponce, A. (2003). La membrana celular. En *Biología celular y molecular*, 1^o ed. Pearson Educación de México. 151-193.
19. Chankitisakul, V. Tharasanit, T. Tasripoo, K. Techakumphu, M. (2010). Chronological Reorganization of Microtubules, Actin Microfilaments, and Chromatin during the First Cell Cycle in Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos. *Veterinary Medicine International*. 2010: 1-8.
20. Chatzimeletiou, K. Morrison, EE. Panagiotidis, Y. Vanderzwalmen, P. Prapas, N. Prapas, Y. Tarlatzis, BC. Handyside, AH. (2012). Cytoskeletal analysis of human blastocysts by confocal laser scanning microscopy following vitrification. *Human Reproduction*. 27:106-13.
21. Chen, C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *The Lancet*. 884-886.

-
22. Chian, RC (2010). Cryobiology: an overview. En *Fertility Cryopreservation*, 1º ed. Cambridge University Press. 1-9.
23. Chian, RC. Kuwayama, M. Tan, L. Tan, J. Kato, O. Nagai, T. (2004). High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *Journal of Reproduction and Development*. 50:685-696.
24. Cooper, GM. Hausman, RE. (2007). Cromosomas y cromatina; citoesqueleto y movimiento celular; ciclo celular; meiosis y fecundación. En *La célula*, 3º ed. Marbán libros, S.L. 150-153, 435-458, 591-598, 608-621.
25. Coticchio, G. Dal Canto, M. Guglielmo, MC. Albertini, DF. Mignini Renzini, M. Merola, M. Lain, M. Sottocornola, M. De Ponti, E. Fadini, R. (2015). Double-strand DNA breaks and repair response in human immature oocytes and their relevance to meiotic resumption. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 32: 1509-1516. (a)
26. Coticchio, G. Dal Canto, M. Mignini Renzini, M. Guglielmo, MC. Brambillasca, F. Turchi, D. Novara, PV. Fadini, R. (2015). Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*. 21: 427-454. (b)
27. Coticchio, G. Guglielmo, MC. Albertini, DF. Dal Canto, M. Mignini Renzini, M. De Ponti, E. Fadini, R. (2014). Contributions of the actin cytoskeleton to the emergence of polarity during maturation in human oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 20: 200-207.
28. Cubillos, S. Caldiño, F. Pedraza, J. Cuneo, S. (2011). Microscopia confocal del huso meiótico de óvulos humanos y su tiempo de recuperación después de la

vitrificación. *Revista Mexicana de medicina de la reproducción*. 2: 63-67.

29. Cuello, C. Sánchez-Osorio, J. Almiñana, C. Gil, MA. Peral, ML. Lucas, X. Roca, J. Vazquez, JM. Martinez, 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.
30. De Munck, N. Vajta, G. (2017). Safety and efficiency of oocyte vitrification. *Cryobiology*. 78: 119-127.
31. Ducolomb, Y. Romo, S. Balcázar, JA. Rodarte, LF. Casas, E. Fragoso, G. Scuitto, E. Betancourt, M. (2005). Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos in vitro. *Técnica Pecuaria en México*. 43: 425-432.
32. 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.
33. Eroglu, A. Bailey, SE. Toner, M. Toth, TL. (2009). successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biology of Reproduction*. 80: 70–78.
34. Fahy, G. (2016). Overview of biological vitrification. En *Vitrification in assisted reproduction*, 2^o ed. RM&ART. 1-22.35.
35. Fahy, G. Wowk, B. (2015). Principles of cryopreservation by vitrification. En *Methods in molecular biology*. Clifton, N.J. 21-82.

-
36. Fernández-Reyes, F. Ducolomb, Y. Romo, S. Casas, E. Salazar, Z. Betancourt M. (2012). Viability, maturation and embryo development in vitro of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology*. 64: 261-266.
37. Gautam, SK. Verma, V. Palta, P. Chauhan, MS. Manik, RS. (2008). Effect of type of cryoprotectant on morphology and developmental competence of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes subjected to slow freezing or vitrification. *Reproduction, Fertility and Development*. 20:490-496.
38. Gomes, C. Merlini, M. Konheim, J. Serafini, P. Motta, EL. Baracat, EC. Smith, GD. (2012). Oocyte meiotic-stage-specific differences in spindle depolymerization in response to temperature changes monitored with polarized field microscopy and immunocytochemistry. *Fertility and Sterility*. 97: 714-719.
39. Gualtieri, R. Mollo, V. Barbato, V. Fiorentino, I. Iaccarino, M. Talevi, R. (2011). Ultrastructure and intracellular calcium response during activation in vitrified and slow-frozen human oocytes. *Human Reproduction*. 26: 2452-2460.
40. Henkel, R. (2012). Sperm preparation: state-of-the-art-physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian Journal of Andrology*. 14: 260- 269.
41. Jin, HX. Song, WY. Xin, ZM. Dai, SJ. Chen, ZJ. Sun, YP. (2012). Effects of cumulus cells on vitreous cryopreservation of human mature oocytes and clinical pregnancy outcomes. *Reproductive Science*. 2: 216-220.
42. Kitaji, H. Ookutsu, S. Sato, M. Miyosh, K. (2015). A new rolling culture-based in vitro fertilization system capable of reducing polyspermy in porcine oocytes. *Animal Science Journal*. 86: 494-498.

-
43. Kopeika, J. Thornhill, A. Khalaf, Y. (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*. 21: 209-227.
- L. Gómez, C. Lozano, J. Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. 57: 291-300.
44. Lawson, A. Ahmad, H. Sambanis, A. (2011). Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions. *Cryobiology*. 62: 115-122.
45. Lei, T. Guo, N. Liu, JQ. Tan, MH. Li, YF. (2014). Vitrification of in vitro matured oocytes: effects on meiotic spindle configuration and mitochondrial function. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 3:1159-1165.
46. Maedomari, N. Kikuchi, K. Ozawa, M. Noguchi, J. Kaneko, H. Ohnuma, K. Nakaj, M. Shino, M. Nagai, T. Kashiwazaki, N. (2007). Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development in vitro. *Theriogenology*. 67: 983-993.
47. Manipalviratn, S. Tong, ZB. Stegmann, B. Widra, E. Carter, J. Decherney, A. (2011). Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration. *Fertility and Sterility*. 95: 1839-1841.
48. Martin, JH. Bromfield, EG. Aitken, RJ. Nixon, B. (2017). Biochemical alterations in the oocyte in support of early embryonic development. *Cellular and Molecular Life Science*. 74: 469-485.
49. 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. *Journal of Reproduction and Fertility*. 118: 163-170.

50. Megías, M. Molist, P. Pombal, MA. (2017). Atlas de histología vegetal y animal, La célula. Citosol. Citoesqueleto. Departamento de Biología Funcional y Ciencias De La Salud. Facultad De Biología. Universidad De Vigo.
51. Misu, S. Takebayashi, M. Miyamoto, K. (2017). Nuclear Actin in Development and Transcriptional Reprogramming. *Frontiers and Genetics*. 8: 27.
52. Moussa, M. Shu, J. Zhang, X. Zeng, F. (2014). Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Science China Life Sciences*. 57: 903-914.
53. Mullen, SF. Fahy, GM. (2012). A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs, and sheep. *Theriogenology*. 78: 1709-1719.
54. Östlund Farrants, AK. (2008). Chromatin remodelling and actin organisation. *FEBS Letters*. 582: 2041-2050.
55. Parkes, AS. (1945). Preserving spermatozoa at low temperatures. *British Medical Journal*. 212-213.
56. Parmegiani, L. Cognigni, GE. Clampaglia, W. Pocognoli, P. Marchi, F. Filicori, M. (2010). Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1: **13-16**.
57. Petters, RM, Wells, KD. (1993). Culture of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 48:61-73.
58. Pirro, V. Oliveri, P. Ferreira, CR. González-Serrano, AF. Machaty, Z. Cooks, RG. (2014). Lipid characterization of individual porcine oocytes by dual mode DESI MS and data fusión. *Analytica Chimica Acta*. 848: 51-60.

-
59. Rajaei, F. Karja, NW. Agung, B. Wongsrikeao, P. Taniguchi, M. Murakami, M. Sambuu, R. Nii, M. Otoi, T. (2005). Analysis of DNA fragmentation of porcine embryos exposed to cryoprotectants. *Reprod Domest Anim.* 40: 429-432.
60. Rall, WF. Fahy, GM. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature.* 313: 573-575.
61. Reece, JB. Urry, LA. Cain, ML. Wasserman, SA. Minorsky, PV. Jackson, RB. (2011). Membrane structure and function. En *Campbell biology*, 10° ed. CA: Pearson. 124-140.
62. Rojas, C. Palomo, MJ. Albarracín, JL. Mogas, T. (2004). Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology.* 49: 211-220.
63. Sánchez-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.
64. Sano, H. Matsuura, K. Naruse, K. Funahashi, H. (2010). Application of a microfluidic sperm sorter to the in-vitro fertilization of porcine oocytes reduced the incidence of polyspermic penetration. *Theriogenology.* 74: 863– 870.
65. Sanusi, R. Yu, Y. Nomikos, M. Lai, FA. Swann, K. (2015). Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase C ζ . *Molecular Human Reproduction.* 21: 783–791.
66. 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.

-
67. Shirazi, A. Golestanfar, A. Bashiri, M. Ahmadi, E. Shams-Esfandabadi, N. (2018). Male Pronuclear Formation and Embryo Development Following Intracytoplasmic Injection of Ovine Pretreated Sperm. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 10: 41–48.
68. Somfai, T. Kikuchi, K. Nagai, T. (2012). Factors affecting cryopreservation of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 58: 17-24.
69. Somfai, T. Noguchi, J. Kaneko, H. Nakai, M. Ozawa, M. Kashiwazaki, N. Egerszegi, I. Rátky, 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.
70. 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. *Biology of Reproduction*. 80:42-49.
71. Somoskoi, B. Martino, NA. Cardone, RA. Lacalandra, GM. Dell'Aquila, ME. Cseh, S. (2015). Different chromatin and energy/redox responses of mouse morulae and blastocysts to slow freezing and vitrification. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 13:22.
72. Sun, Qy. Lai, L. Wu, Gm. Park, Kw. Day, Bn. Prather, R. Schatten, H. (2001). Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, γ -Tubulin, and MAP Kinase. *Molecular Reproduction and Development*. 60:481-490.
73. Suttirojpatana, T. Somfai, T. Matoba, S. Nagai, T. Parnpai, R. Geshi, M. (2016). Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves

embryo development after ICSI. *The Journal of Reproduction and Development*. 62: 577–585.

74. Suzuki, H. Jeong, BS. Yang, X. (2000). Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biology Reproduction*. 63: 723-729.

75. Suzuki, H. Saito, Y. Kagawa, N. Yang, X. (2003). In Vitro fertilization and polyspermy in the pig: factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte. *Microscopy Research and Technique*. 61: 327-334.

76. Suzuki, H. Takashima, Y. Toyokawa, K. (2002). Cytoskeletal organization of porcine oocytes aged and activated electrically or by sperm. *Journal of Reproduction and Development*. 48: 293-301.

77. Tanihara, F. Nakai, M. Kaneko, H. Noguchi, J. Otoi, T. Kikuchi, K. (2013). Evaluation of zona pellucida function for sperm penetration during in vitro fertilization in pigs. *Journal of Reproduction and Development*. 59: 385-392.

78. Trounson, A, Wood, C. Leeton, J. (1983). Pregnancy in an infertile patient after transfer of an embryo fertilized in vitro. *British Medical Journal*. 286: 1351-1352.

79. Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*. 60: 357-364.

80. Vicente, JS. García-Ximénez, F. (1994). Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenology*. 42:1205-1215.

81. Wang, H. Kim, NH.(2016). CDK2 Is Required for the DNA Damage Response During Porcine Early Embryonic Development. *Biology of Reproduction*. 95:31.

82. Wan-Hafizah, WJ. Nor-Ashikin, MNK. Rajikin, MH. Nuraliza, AS. Zainuddin, H.

Nor-Shahida, AR. Salina, O. Razif, D. Norhazlin, J. Mohd-Fazirul, M. Nur-Sakina, KA. Kapitonova, M. (2015). Organization of cytoskeleton and chromatin is related to the timing of the first zygotic cleavage and early developmental competence. *Biomedical Research*. 26: 286-292.

83. Wu, C. Rui, R. Dai, J. Zhang, C. Ju, S. Xie, B. Lu, X. Zheng, X. (2006). Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 73: 1454-1462.

84. Zhou, G. B., & Li, N. (2009). Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. *Molecular Human Reproduction*. 15: 279-285.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 0004

Módulo 21590262

VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS
PORCINOS Y SU EFECTO EN LA
DISTRIBUCIÓN DE
MICROFILAMENTOS Y CROMATINA
DURANTE EL DESARROLLO
EMBRIONARIO TEMPORARIO METROPOLITANA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDA

DALAPA

05 JUN 2018

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 4 del mes de junio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMIREZ
DRA. EDITH ARENAS RIOS
MTRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS
DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ALMA GUADALUPE LOPEZ LOPEZ

y de acuerdo con el artículo 70 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

- APROBAR -

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB
RAMIREZ

VOCAL

DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

MTRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

SECRETARIO

DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO