



UNIDAD IZTAPALAPA

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

**DESARROLLO Y VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN*
VITRO DESPUÉS DE SER VITRIFICADOS CON ETILÉN GLICOL Y
TREHALOSA EN LA PAJILLA CON BORDE BISELADO (BES)**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

M. V. Z ALDO DANIEL GARCÍA RICO

CO-DIRECTORES

INTERNO: DR. EDUARDO CASAS HERNÁNDEZ

EXTERNO: DR. FILIBERTO FERNÁNDEZ REYES

ASESORA

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ

México, D. F, 13 de Octubre de 2016

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR:

Dr. Eduardo Casas Hernández

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM- Iztapalapa

CO-DIRECTOR:

Dr. Filiberto Fernández Reyes

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Manejo de la Reproducción

Departamento de Producción Agrícola y Animal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM- Xochimilco

ASESORA:

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Profesor Titular “C”

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud, 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 de CONACyT (PNPC) registro 003797.

Número de CVU 570420 y becario otorgado por CONACyT 306124

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. **“DESARROLLO Y VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO DESPUÉS DE SER VITRIFICADOS CON ETILÉN GLICOL Y TREHALOSA EN LA PAJILLA CON BORDE BISELADO (BES)”** que presentó Aldo Daniel García Rico en octubre de 2016.



PRESIDENTE

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



SECRETARIO

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

Dr. Salvador Romo García

Laboratorio de Reproducción

Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán

Universidad Nacional Autónoma de México



VOCAL

Dra. María Margarita Zayil Salazar

Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Manejo de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco y fue apoyado por CONACyT, México (CVU/No. Becario 570420/306124/).

Al Dr. Filiberto Fernández Reyes por su infinita paciencia y sabiduría; por su apoyo en los momentos más complicados y ser un ejemplo a seguir.

A la Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez por compartir su amplio conocimiento, experiencia y sus excelentes consejos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Eduardo Casas Hernández por dedicarme el tiempo necesario a pesar de sus múltiples actividades y por el apoyo brindado.

A Rosy Ávalos Martínez por ser una parte fundamental en mi vida, por estar siempre dispuesta a escucharme y apoyarme.

A Yury Grisel Soto Martínez por ser la cómplice de mis aventuras y un ejemplo a seguir, gracias por todo lo vivido estos años.

A todas las personas que pusieron un granito de arena para lograr esta gran meta en mi vida.

DEDICATORIA

A la memoria de mi sobrino **Lucio Oziel Cruz García (†)**, un Ángel que nos cuida y nos bendice desde el cielo y que en tan pocos días se ganó el corazón de muchas personas. Eres y serás siempre mi máxima motivación para seguir adelante.

A mi Mamá Ma. Rosario Rico Labra por darme la oportunidad de existir e impulsarme siempre a ser una persona de bien. Por ser la mujer más importante en mi vida y mi mayor ejemplo.

A mi Papá Samuel García García por brindarme siempre su apoyo, por ser mi ejemplo de entrega y trabajo.

A mi Hermana Karina por ser una mujer fuerte con muchas ganas de salir adelante a pesar de que la vida le ponga pruebas tan complicadas. A Lucio por ser un ejemplo a seguir.

A mis sobrinas Janet y Jaretzi por ser mi motivación a seguir adelante.

A mis abuelos Felipe (†) y Juana (†) porque no hay nadie en el mundo que me haya enseñado a dar tanto amor y cariño a todos sin distinción.

A mis abuelos Rutilio y Juana por su apoyo.

RESUMEN

Este estudio fue diseñado para evaluar la eficiencia de la vitrificación de embriones bovinos en estadio de mórula, utilizando etilenglicol (EG) y trehalosa en la pajilla con borde biselado (beveled edge straw; BES) y sus efectos en la viabilidad y el potencial de desarrollo post-desvitrificación. Para la producción *in vitro* (PIV) de embriones, los ovarios se colectaron en un rastro y se transportaron al laboratorio en solución salina al 0.9%, se puncionaron los folículos de 2-8 mm de diámetro para la obtención de los complejos ovocitos células del cúmulo (COCs), obteniendo un total de 678 COCs, los cuales fueron sometidos a la maduración *in vitro* (MIV) en el medio TCM-199 por 24 h; tomando aleatoriamente 84 ovocitos para la evaluación de la MIV mediante tinción de Hoechst. La fertilización *in vitro* (FIV) se llevó a cabo en el medio mTBM con semen descongelado, co-incubando los gametos por 18 h, finalizado este periodo se tomaron aleatoriamente 78 de ellos para evaluar la FIV. Los restantes 516 supuestos cigotos se dividieron en dos grupos: Grupo1: embriones sin vitrificar y desarrollados hasta mórulas en el día 5 post-inseminación, que fueron desarrolladas hasta blastocisto (grupo control). Grupo 2: se incluyeron un total de 421 presuntos cigotos que se dividieron en: grupo 2A: 217 presuntos cigotos para su desarrollo, las mórulas obtenidas se mantuvieron vitrificadas durante 15 días, posteriormente se desvitrificaron para evaluar la viabilidad. El grupo 2B: se incluyeron 204 presuntos cigotos, las mórulas desarrolladas se vitrificaron por el mismo periodo del grupo anterior y se cultivaron por 72 horas para su desarrollo a blastocisto (día 8 post-inseminación) y por 48 horas más para determinar el porcentaje de eclosión. Los resultados fueron los siguientes: En el grupo de mórulas sin vitrificar, la división embrionaria fue de 73.6%, alcanzando un porcentaje de blastocistos de 32.8% y una relación blastocistos/mórulas de 23/36. La viabilidad de las mórulas desvitrificadas fue de 38.7%, mientras que en las mórulas cultivadas post-vitrificación el 27.9% alcanzó el estadio de blastocisto. Finalmente el porcentaje de eclosión de las mórulas que desarrollaron a blastocistos fue de 47.3%. El desarrollo embrionario obtenido en las mórulas no vitrificadas fue acorde a lo reportado en la literatura, demostrando que el protocolo de PIV de embriones es capaz de proveer embriones en estadio de mórula y blastocisto. La BES resultó ser un recipiente adecuado al conservar la viabilidad, recuperación y el potencial de desarrollo embrionario, con la ventaja de ser un recipiente económico y de fácil acceso. El presente trabajo es el primer reporte de mórulas PIV, vitrificadas en BES llegando a obtener la eclosión de los blastocistos.

Palabras clave: Fertilización *in vitro*, mórula, bovinos, vitrificación, etilenglicol, trehalosa, pajilla con borde biselado (BES).

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the efficiency of bovine embryo vitrification in the morula stage, using Ethylene Glycol (EG) and trehalose in the beveled straw (beveled edge straw; BES) and its effects in viability and development potential after devitrification. For embryo production *in vitro* (IVP) ovaries were collected at a slaughterhouse and were transported to the laboratory in 0.9% saline solution, follicles 2 to 8 mm in diameter were punctured to collect cumulus-oocyte complexes (COCs), obtaining a total of 678 COCs, which were subjected to *in vitro* maturation (IVM) in TCM-199 medium for 24 h, randomly using 84 oocytes to evaluate IVM by Hoechst staining. *In vitro* fertilization (IVF) was performed in mTBM medium, using frozen semen during 18 h of co-incubation; at the end of this period 78 oocytes were randomly used to evaluate IVF. The remaining 516 presumptive zygotes were divided in two groups: Group 1: embryos not exposed to vitrification and developed to the morula stage on day 5 post-insemination, which were developed to blastocyst (control group). Group 2: a total of 421 presumptive zygotes which were divided in groups 2A: presumptive zygotes for development, those developing to morulae were vitrified for 15 days and then devitrified to evaluate viability. In group 2B, 204 presumptive zygotes were included, the developing morulae were vitrified for the same period as the previous group and cultured for 72 hours, for development to blastocyst (day 8 post-insemination) and for 48 more hours to determine their eclosion rate. The results were as follows: In the group of morulae without vitrification, embryo cleavage was 73.6%, reaching a blastocyst development rate of 32.8% and a blastocyst/morulae ratio of 23/26. The viability of the devitrified morulae was 38.7%, while in the morulae cultured after devitrification, 27.9% reached the blastocyst stage. Finally, the hatching percentage of the morulae developing to blastocysts was 47.3%. Embryo development obtained in the non-vitrified morulae was in agreement with literature reports, demonstrating that the IVP protocol is capable to provide morula and blastocyst stage embryos. The BES showed to be an appropriate device, preserving viability, recovery and embryo development potential, with the advantage of being an economical device of easy access. This study is the first report of IVP morulae, vitrified in BES allowing blastocyst hatching.

Key words: *In vitro* fertilization, morula, bovine, vitrification, ethylene glycol, trehalose, beveled edge straw (BES).

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Ovogénesis.....	3
I.2 Foliculogénesis.....	4
I.3 Ondas de desarrollo folicular.....	5
I.4 Fertilización <i>in vitro</i>	6
2. ANTECEDENTES.....	12
I.5 Vitricación de embriones producidos <i>in vitro</i>	12
I.6 Tipos de crioprotectores.....	13
I.7 Tipos de recipientes.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	19
5. HIPÓTESIS.....	19
6. OBJETIVOS.....	20
6.1 General.....	20
6.2 Particulares.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1 Colección y maduración de los ovocitos.....	21
7.2 Cultivo de células del <i>cúmulo</i>	22
7.3 Fertilización <i>in vitro</i>	22
7.4 Evaluación de la MIV y FIV.....	23
7.5 Evaluación del desarrollo embrionario.....	24
7.6 Desarrollo embrionario en el grupo 1 sin vitricar.....	24
7.7 Evaluación de la viabilidad en las mórulas desvitricadas (grupo 2A).....	25
7.8 Evaluación de la viabilidad y el desarrollo embrionario post-vitricación (Grupo 2B).....	25

7.9 Preparación de la pajilla con borde biselado (BES).....	25
7.10 Vitrificación de la mórulas.....	26
7.11 Desvitrificación de las mórulas.....	27
7.12 Diseño experimental	27
7.13 Análisis estadístico.....	28
8. RESULTADOS.....	29
8.1 Maduración <i>in vitro</i>	29
8.2 Fertilización <i>in vitro</i>	29
8.3 Producción de embriones no vitrificados y desarrollados hasta blastocisto.....	30
8.4 Viabilidad de las mórulas desvitrificadas.....	31
8.5 Desarrollo de blastocistos a partir de las mórulas desvitrificadas.....	32
9. DISCUSIÓN.....	34
10. CONCLUSIONES.....	40
11. BIBLIOGRAFÍA.....	41
12. ANEXOS.....	51

ABREVIATURAS

BES	Pajilla con borde biselado (bevelled edge straw)
BO	Brackett & Oliphant
BSA	Albúmina sérica bovina
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CR1	Charles Rosenkrans
COCs	Complejo ovocito-células del cúmulo
CP	Cuerpo polar
CVM	Método de vitrificación criológica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPBS	Solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco
EG	Etilenglicol
EMG	Electron microscope Grid
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
KSOM	Medio optimizado de potasio
LH	Hormona luteinizante
MI	Metafase I
MII	Metafase II
MIV	Maduración <i>in vitro</i>
mTBM	Medio amortiguado con Tris modificado
MTT	Metil-tiazol-tetrazolio
NL	Nitrógeno líquido
OPS	Open Pulled Straw: Pajilla abierta estirada
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PHE	Penicilamina, hipotaurina y epinefrina
PIV	Producción <i>in vitro</i>

PN	Pronúcleos
PVA	Alcohol polivinílico
PVP	Polivinil pirrolidona
SFB	Suero fetal bovino
SOFaa	Fluido oviductual sintético con aminoácidos
SOPS	Super Open Pulled Straw: Pajilla abierta super estirada
TCM-199	Medio de cultivo de tejidos 199
TL-HEPES-PVA:	Medio con sales de Tyrode, lactato, HEPES y alcohol polivinílico
VG	Vesícula germinal

1. INTRODUCCIÓN

En la reproducción bovina el desarrollo de biotecnologías, entre las que destacan la superovulación, la producción *in vitro* (PIV) de embriones y la micromanipulación de embriones entre otras, se ha logrado un gran avance en cuanto al número de embriones que se pueden obtener de una sola vaca de alto valor genético, aumentando su capacidad reproductiva (Guerra *et al.*, 2012). El desarrollo de estas técnicas ha sido de gran importancia para conocer los eventos que involucran el control de la maduración del ovocito, la fertilización y las primeras fases del desarrollo embrionario, así como aspectos metabólicos del embrión preimplantado y las interacciones que se establecen entre los gametos y el tracto reproductivo con el embrión (materno-embriónicas). El embrión bovino sirve como modelo experimental para otras especies (incluida la humana) (Gordon, 1994; Ahumada *et al.*, 2013; Gonella *et al.*, 2013). La PIV de embriones ha impactado también los sistemas ganaderos, favoreciendo el mejoramiento genético con el comercio de embriones provenientes de animales genéticamente superiores (Gordon, 1994; Gonella *et al.*, 2013). La PIV se ha incrementado en los últimos 15 años, hasta alcanzar el 42% (más de medio millón) de los embriones totales producidos en 2013 (Blondin, 2015).

Una desventaja de transferir los embriones es que se requiere de una amplia disponibilidad de hembras receptoras, previamente sincronizadas y listas para recibir los embriones; así como también es necesario cubrir el mantenimiento de las receptoras, aumentando los costos de producción (Ramírez y Bernal, 2012). La criopreservación de embriones permite preservarlos por un tiempo superior al que se acostumbra en programas de transferencia inmediata y almacenarlos indefinidamente para incluso comercializarlos en todo el mundo (Guerra *et al.*, 2012; Do *et al.*, 2014).

Independientemente del método utilizado para la producción de embriones, estos se pueden criopreservar por medio de la congelación o la vitrificación. En los embriones obtenidos *in vivo*, al ser de mejor calidad, se utiliza la congelación

lenta, mientras que en los producidos *in vitro*, que tienen menor calidad (Do *et al.*, 2014), existe una alternativa como la vitrificación, que es un procedimiento para la conservación de embriones en el que se disminuye la formación de cristales de hielo, pero puede dañar componentes morfológicos y funcionales de las células por las altas concentraciones de crioprotectores que se utilizan (Vajta, 2000). Sin embargo, ésta se realiza en menos tiempo que la congelación y sin el uso de equipos costosos (Fernández *et al.*, 2012; Do *et al.*, 2014).

Actualmente existe una gran variedad de protocolos de vitrificación que utilizan diferentes tiempos, temperaturas y crioprotectores, siendo necesario aún investigar el efecto de diferentes crioprotectores para minimizar el daño y aumentar la eficiencia de la técnica, así como también brindar opciones en los recipientes utilizados para la vitrificación. Los recipientes más utilizados en la vitrificación son: pajillas de 0.5 mL (Gordon, 1994), pajillas de 0.25 mL (Kuwayama *et al.*, 2005), pajilla abierta estirada (OPS) (Rojas *et al.*, 2004), pajilla abierta super estirada (SOPS) (Isachenko, 2005), Cryoloop (Lane *et al.*, 1999; Kawakami *et al.*, 2008), Cryolock (Garcia *et al.*, 2011) y Cryotop (Kuwayama *et al.*, 2005; Nagashima *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008). Dependiendo del recipiente que se utilice varía el volumen del medio de vitrificación y las barreras que afectan las tasas de enfriamiento (Do *et al.*, 2014). Recientemente en el laboratorio Manejo de la Reproducción (Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco) se ha utilizado la pajilla con borde biselado (beveled edge straws; BES), como una alternativa económica en el montaje de esta técnica (Fernández *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013).

El estadio de desarrollo embrionario en que se vitrifique puede influir en los resultados, siendo mórulas y blastocistos los que proporcionan mejores resultados, ya que se ha demostrado que embriones vitrificados en estadios más tempranos de desarrollo (5-8 células), disminuyen su potencial de viabilidad y desarrollo (Asgari *et al.*, 2012).

La formación y maduración del ovocito se inicia en el ovario y de forma natural puede ser fertilizado *in vivo* o bien puede ser obtenido del ovario en estado

inmaduro por diferentes procedimientos y completar su maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y lograr su desarrollo embrionario *in vitro*, esto último dependiendo de los diferentes objetivos de investigación a realizar. A continuación se describen aspectos importantes en la formación del ovocito.

1.1 Ovogénesis

El ovocito debe ser competente para completar la meiosis y convertirse en una célula haploide, prepararse citoplasmáticamente para la fertilización, reprogramar la cromatina del espermatozoide y su propia cromatina, de manera que se formen los dos pronúcleos funcionales, dirigir el desarrollo temprano e inducir la activación genómica del embrión (Gonella *et al.*, 2013).

La gametogénesis en mamíferos se produce por procesos de división mitótica y meiótica. Las ovogonias son células diploides ($2n$) que se producen a partir de las células germinales primordiales durante el desarrollo embrionario. Posteriormente, estas células sufren mitosis para convertirse en ovocitos primarios. La primera división meiótica, en la mayoría de los mamíferos, queda detenido en el estadio de diploteno de la profase I durante la vida fetal y se reanuda hasta que se alcanza la pubertad. El núcleo del ovocito se conoce como vesícula germinal (VG). Durante la pubertad, la acción de las gonadotrofinas permite el proceso de reanudación meiótica y la expulsión del primer cuerpo polar en la etapa de metafase II. En este momento, se forma un ovocito secundario el cual ya es haploide (n). Nuevamente, la meiosis queda detenida hasta que se generen los procesos de ovulación y fertilización. Si el ovocito es fecundado, finaliza la segunda división meiótica que incluye la expulsión del segundo cuerpo polar y formación de los pronúcleos. Finalmente se obtiene un cigoto, que presenta nuevamente un número cromosómico diploide ($2n$) (Casillas, 2014).

En la hembra bovina la ovogénesis inicia en las fases tempranas de la vida fetal, aproximadamente entre los 120 y 140 días de gestación y finaliza con la formación de un determinado número de folículos primordiales (Peña *et al.*, 2007).

1.2 Foliculogénesis

La foliculogénesis o desarrollo folicular es un proceso continuo que se produce en las hembras de los mamíferos, y que da como resultado la ovulación a partir de un folículo maduro o involución del mismo. Este proceso es el resultado de la interacción de múltiples componentes celulares que constituyen el folículo y de múltiples factores que son producidos en el ovocito, en las células de la granulosa o en las células de la teca, y que son controlados bajo el influjo de diferentes factores autocrinos, paracrinos o endocrinos (Velásquez y Mendieta, 1999).

Bajo la influencia de las gonadotrofinas, los folículos sintetizan hormonas esteroides, tales como andrógenos y estrógenos, las cuales contribuyen al desarrollo folicular, al inducir la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa a través de receptores a andrógenos y receptores a estrógenos, respectivamente. Las células de la teca producen andrógenos bajo la influencia de un estímulo de la hormona luteinizante (LH), mientras que las células de la granulosa producen estrógenos, utilizando los andrógenos como sustrato, bajo la influencia de la hormona folículo estimulante (FSH) (Casillas, 2014).

En la foliculogénesis, un folículo primordial entra al grupo de crecimiento, y puede seguir dos caminos: la degeneración por atresia (sufrida por el 99% o más) o la ovulación alcanzada por muy pocos (menos del 1%). En los bovinos el periodo que se requiere desde la activación de un folículo primordial estático hasta la ovulación, es de aproximadamente 180 días (Webb *et al.*, 2004). Los folículos primordiales, están formados por el ovocito primario detenido en la profase de su primera división meiótica (diploteno) rodeado por una capa plana de células de la granulosa. Estos folículos forman la reserva gametogénica o población de folículos de reserva, que una hembra va a utilizar en toda su historia reproductiva, a partir de estos folículos de reserva se originan los folículos de crecimiento; en el ovario de los bovinos se estima que hay de 25 000 a 42 000 folículos primordiales (Gigli *et al.*, 2006).

Posteriormente, el folículo primordial continúa su desarrollo a los denominados folículos preantrales: folículo primario y folículo secundario. En el folículo primario las células planas de la granulosa antes de comenzar a dividirse por mitosis se diferencian en una capa de células de forma cúbica que rodea al ovocito primario y la teca interna comienza su diferenciación. Por acción de las hormonas esteroideas, el folículo secundario completa la proliferación de las células de la granulosa y las mismas aumentan de tamaño. Después, se produce la formación de la cavidad del folículo, que se denomina antral, estos folículos antrales se pueden encontrar en el ovario bovino con diámetros comprendidos en el rango de 0.1 a 20 mm (Fernández, 2003). Los folículos terciarios se caracterizan por estar rodeados de varias capas cúbicas de células de la granulosa que comienzan a secretar un trasudado que se denomina líquido folicular, que al acumularse produce un reordenamiento de las mismas en células del cúmulo y murales. Por último se encuentran los folículos preovulatorios o folículos de Graaf, los cuales son los folículos que se encuentran listos para ovular (Gigli *et al.*, 2006).

1.3 Ondas de desarrollo folicular

Una onda de desarrollo folicular se define como el desarrollo armónico y simultáneo de un grupo de folículos antrales pequeños, en promedio 24 por onda con un rango de 8 a 41, funcionando en tres fases: reclutamiento, selección y dominancia folicular (Fernández, 2003). En los bovinos durante un ciclo estral normal se puede observar la presencia de dos o tres ondas foliculares por ciclo. A continuación se detallan las fases que componen las ondas de desarrollo folicular: **Reclutamiento:** Esta fase es un proceso regulado por la FSH, consiste en que un conjunto de folículos antrales tempranos (2-3 mm de diámetro) comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrófico que les permite progresar a la ovulación. El reclutamiento folicular se refiere a la formación de una población de folículos antrales de donde uno o varios, dependiendo de la especie (monotoca

o politoca) es seleccionado para la ovulación. En cada ciclo ovárico es reclutado un grupo de folículos primordiales que crecen de manera continua debido a los incrementos en las concentraciones de FSH. Cuando la FSH alcanza el pico de concentración, los folículos más grandes de la onda tienen un diámetro de aproximadamente 4 mm (Castañeda 2009).

Selección. En este proceso uno de los folículos que ha iniciado su crecimiento adquiere la competencia para alcanzar la ovulación. La selección folicular ocurre al final de la fase de crecimiento. El folículo dominante crece a una tasa constante y el resto de los folículos subordinados sufren atresia o temporalmente crecen a una velocidad menor y posteriormente dejan de hacerlo. A este fenómeno se le ha denominado desviación. La desviación durante la oleada folicular en bovinos empieza con una reducción en la tasa de crecimiento de los folículos subordinados; en contraste, se presenta una tasa de crecimiento constante en el folículo dominante (Castañeda 2009).

Dominancia. En esta fase el folículo seleccionado inhibe o impide el reclutamiento de una nueva serie de folículos. La dominancia folicular en la vaca se caracteriza por dos fenómenos: la divergencia en el crecimiento entre el folículo mayor y el segundo mayor; y una disminución del número de folículos pequeños correlacionada con el crecimiento del folículo mayor (Castañeda 2009).

1.4 PIV de embriones.

En la actualidad la producción animal ha comenzado a depender en gran medida de los avances biotecnológicos; así, en el área de la reproducción, el manejo de ésta, a través de la inseminación artificial y la transferencia embrionaria han significado uno de los mayores impactos dentro de los programas reproductivos y de mejoramiento genético. De esta manera, el desarrollo de otras biotecnologías reproductivas como es la FIV, una tecnología emergente aplicada en los países desarrollados a animales de producción, para mejorar su eficiencia reproductiva y genética, ha comenzado a mostrar logros importantes, no obstante

aún está en etapa de investigación (Ratto *et al.*, 1999; Henrique *et al.*, 2012; Hirayama *et al.*, 2014; Parrish, 2014).

Desde 1981, año en que nació el primer ternero procedente de un embrión PIV (Brackett *et al.*, 1982), esta técnica ha experimentado una evolución considerable. La diferencia más importante de la PIV radica principalmente en el costo por embrión, pues un embrión producido *in vitro* tiene un valor 10 veces menor a uno producido *in vivo* y para producir 100 embriones *in vitro* es suficiente una dosis de semen mientras que se requieren de dos dosis de semen para producir de 4 a 6 embriones en una vaca superovulada (Alberio, 1999). Además de que *in vitro* se pueden llegar a producir 3.4 veces más embriones y 3.2 más gestaciones en un periodo de 60 días con sólo una hembra sometida a superovulación (Palma, 2001; Martínez, 2013).

La PIV consta de varias etapas, cada una de las cuales puede afectar los resultados finales del proceso. Estas etapas pueden resumirse en las siguientes: obtención y selección de los ovocitos, MIV, FIV y CIV de embriones.

Obtención de ovocitos: Puede ser a partir de los ovarios de hembras sacrificadas en rastro y la aspiración de los folículos con un diámetro entre 2-8 mm. También es posible obtenerlos a partir de animales vivos utilizando la técnica de *ovum pick up* (OPU), también conocida como técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (Pieterse *et al.*, 1987; Kruij *et al.*, 1994).

Selección de los ovocitos: La vaca es una especie mono-ovulatoria por lo que una parte de los ovocitos obtenidos tras la aspiración folicular están destinados a degenerar. Lo anterior hace necesario estimar la calidad de los ovocitos antes de utilizarlos para la MIV, ya que solamente una parte de los mismos tienen la capacidad de ser fecundados y soportar el desarrollo embrionario (Herradón *et al.*, 2007).

La selección de los ovocitos se realiza generalmente con base en tres criterios: el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo

que los rodea. El diámetro de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar, de tal forma que aquellos con un diámetro inferior a 110 μm se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han adquirido aun la capacidad para madurar (Herradón *et al.*, 2007).

Los ovocitos rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células, presentan mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo hasta blastocistos, que los que carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiata (Herradón *et al.*, 2007).

MIV: En muchos laboratorios se continúa empleando el procedimiento empleado por Fukui y Ono (1989), que consiste en cultivar durante 24 horas los ovocitos inmaduros en Medio TCM-199, suplementado con 10% de suero fetal, gonadotropinas (FSH y LH), y 17 β estradiol a una temperatura constante de 38.5 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire (Herradón *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013).

El medio TCM-199 fue diseñado para cubrir las necesidades de las células somáticas durante prolongados periodos de cultivo (Herradón *et al.*, 2007). Este medio ha sido suplementado con diversas sustancias proteicas, destacando el suero fetal, la albúmina sérica bovina (BSA) y algunas hormonas. Se ha comprobado que el suero favorece la maduración de los ovocitos bovinos, pero su composición compleja, indefinida y variable transforma en indefinido cualquier medio de cultivo al que sea añadido, además, representa un riesgo sanitario. La sustitución de estas proteínas por macromoléculas sintéticas no metabolizables como alcohol polivinilico (PVA) permite obtener resultados similares y al mismo tiempo disponer de un medio de maduración químicamente definido. Por otra parte, se han empleado durante mucho tiempo gonadotropinas hipofisarias o placentarias para favorecer la maduración de los ovocitos bovinos. No obstante, estas sustancias presentan grandes variaciones en su grado de pureza y contiene numerosos contaminantes, lo que ocasiona que los resultados obtenidos sean en muchas ocasiones contradictorios, muy variables y difíciles de comparar. En la

actualidad se pueden sustituir por FSH y LH de origen recombinante, cuya elevada pureza permitirá determinar con claridad sus acciones individuales, al tiempo que evita los efectos de la contaminación cruzada de los productos de origen hipofisario.

FIV: Una vez que se tienen los ovocitos maduros, el siguiente objetivo es lograr su fertilización, para ello se incuban con espermatozoides capacitados. La capacitación espermática es fundamental para que estos sean aptos para fertilizar *in vivo*, este proceso ocurre en el tracto genital de la hembra mediante la remoción de factores descapacitantes; incluyendo modificaciones bioquímicas que resultan en desestabilización de la membrana plasmática y la hiperactivación, ambos procesos esenciales para que ocurra la reacción acrosomal y la posterior penetración del espermatozoide en el ovocito (Gonella *et al.*, 2013).

Los mecanismos de capacitación espermática aún no están bien definidos, pero se reconoce que algunos glucosaminoglicanos presentes en el tracto genital femenino son los responsables de la eliminación de componentes adheridos a la membrana del espermatozoide, alteración de la composición lipídica de su membrana, aumento de la permeabilidad de los iones de Ca⁺, cambios en el pH intracelular y un aumento del metabolismo (Gonella *et al.*, 2013).

Los glucosaminoglicanos son polímeros lineales constituidos por la sucesión de unidades estructurales disacáridas formadas generalmente por un ácido urónico y una hexosamina (Palma, 2001). En el proceso *in vitro*, la heparina es el glucosaminoglicano más extensamente utilizado para capacitar los espermatozoides bovinos (Gonella *et al.*, 2013).

Existe variación individual entre toros, en cuanto a la concentración de heparina necesaria para la capacitación espermática, sin embargo, la concentración ideal de heparina varía de 2 a 100 µg/ml de medio (Gordon, 1994). Otras sustancias han sido utilizadas en los medios para realizar el proceso de capacitación *in vitro*, como la catecolamina, adrenalina e hipotaurina, con lo cuales

se ha encontrado un notable aumento en la motilidad espermática y la penetración del ovocito (Palma, 2001).

Las técnicas más utilizadas para la separación de espermatozoides vivos, de los demás componentes seminales y de los crioprotectores son el “swim up”, los gradientes de percoll y el lavado espermático (Palma, 2001).

Una vez que se tienen los espermatozoides viables, se debe proporcionar un ambiente apto para que ocurra la capacitación espermática y la fertilización. Dicho ambiente debe permitir el correcto metabolismo de las células del *cumulus* y del ovocito y mantener la función espermática eficiente. Para esto, al medio se le puede adicionar heparina para la capacitación. El co-cultivo (espermatozoides-ovocitos) es realizado por un periodo ente 18 y 22 horas, a una temperatura de 39 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ (Palma, 2001). De igual forma, en algunos laboratorios se suele adicionar al medio PHE (penicilamina, hipotaurina, epinefrina), con el fin de aumentar la motilidad espermática y de facilitar su penetración, incrementando los índices de fertilización (Gonella *et al.*, 2013).

Cultivo *in vitro* de embriones (CIV): Al finalizar la etapa de FIV, los ovocitos fertilizados son cultivados para permitir que se desarrollen. Para lograr este objetivo se han diseñado diferentes medios dependiendo de la especie y se han tenido que hacer modificaciones, ya que la glucosa es la principal fuente de energía consumida por las células embrionarias, se ha demostrado que tiene efectos perjudiciales en el desarrollo temprano de embriones mamíferos como el aumento de las concentraciones radicales libres intracelulares, por esta razón, las fuentes de energía elegidas preferentemente para los medios de cultivo *in vitro* (CIV) son el piruvato y el lactato. Otro factor a considerar es la tensión de oxígeno que en el tracto reproductivo de la mayoría de embriones mamíferos es de 3.5 a 8%, debido a esto los embriones deben ser cultivados *in vitro* usando una tensión de oxígeno similar (Gordon, 1994)

Entre los medios más usados para el CIV de embriones bovinos cabe mencionar: el medio Charles Rosenkrans (CR1) (Ferguson *et al.* 2012), el fluido

oviductual sintético (SOF) (Block *et al.*, 2009) y el medio optimizado simple de potasio (KSOM) (Pahuara y Naveros, 2014). Se ha observado que el cultivo post-fertilización, es uno de los periodos más importantes para el desarrollo de embriones bovinos cuando se cultivan en cantidades pequeñas (5 a 10) (Ahumada *et al.*, 2013). También se han clasificado los medios para el CIV de los embriones bovinos en tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y co-cultivo con células somáticas; semidefinidos cuando se omite el co-cultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica y definidos, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el PVA (Herradón *et al.*, 2007).

Aunque los porcentajes de MIV y FIV son altas (aproximadamente 90 y 80%, respectivamente), una parte de los ovocitos fertilizados sólo se dividen hasta la etapa de 2 a 4 células y no todos son capaces de alcanzar la etapa de blastocisto (Ahuja *et al.*, 2009). Existe un bloqueo durante el desarrollo embrionario, que es un fenómeno que ocurre en varias especies (por ejemplo del tercero al cuarto ciclo celular en humanos, segundo ciclo en ratones y durante la transición entre el cuarto y quinto ciclo celular en bovinos), debido a la incapacidad de activación de los genes cigóticos para continuar su división celular. Es decir, este momento de bloqueo específico de la especie está asociado con la etapa de desarrollo, en que los embriones tienden a depender de la transcripción del ARNm a partir de su propio genoma para continuar su división (Tarazona *et al.*, 2010; Asgari *et al.*, 2012). Los embriones de bovino que logran alcanzar una etapa de desarrollo embrionario de 8 a 16 células, se dice que han superado la etapa de bloqueo debido a la activación del genoma embrionario, y pueden ser seleccionados para ser criopreservados, representando una ventaja al vitrificar embriones que han superado esta etapa de desarrollo embrionario. La etapa de desarrollo de los embriones puede ser determinante en los resultados favorables, en embriones de bovino vitrificados en estadio de mórula y blastocisto ha tenido mejores resultados que embriones en etapas más tempranas de desarrollo (Asgari *et al* 2012).

2. Antecedentes

2.1 Vitricación de embriones bovinos producidos *in vitro*.

La vitricación de embriones PIV facilita el uso de programas de transferencia de embriones y el establecimiento de bancos de germoplasma con acceso permanente a material genético de un determinado individuo o raza. Conservar embriones a bajas temperaturas (-196 °C en nitrógeno líquido; NL) permite detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, la respiración, metabolismo, crecimiento y la multiplicación celular, con lo que se reduce drásticamente la actividad fisiológica del embrión. Debido a lo anterior se ha logrado la conservación de embriones por largos periodos de tiempo sin pérdida de su viabilidad (Gordon, 1994).

La definición de vitricación es la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin formación de cristales de hielo. Podría considerarse un aumento extremo de la viscosidad (Vajta, 2000). El nombre hace referencia a la apariencia macroscópica que toma dicha solución, permaneciendo clara y transparente, en estado vítreo (Vajta *et al.*, 2006).

La congelación lenta y la vitricación han sido utilizadas para criopreservar los embriones bovinos PIV. Una de las ventajas de la vitricación es que no hay necesidad de costosos congeladores programables porque las muestras se sumergen directamente en LN. Por otra parte, la vitricación es sencilla y rápida, por lo que es una buena opción para la criopreservación de embriones PIV. En términos de supervivencia de los embriones después del calentamiento o desvitricación, la vitricación de embriones bovinos PIV ha mostrado ser tan eficaz o mejor que la congelación lenta bajo diferentes condiciones experimentales (Caamaño *et al.*, 2015).

Durante la vitricación, el bajo volumen permite una tasa de enfriamiento rápida (15 000 y 30 000 °C/minuto) disminuyendo las lesiones osmóticas, causadas por las altas concentraciones de crioprotectores y la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares (Ramírez y Bernal, 2012).

2.2 Tipos de crioprotectores

Los crioprotectores son moléculas empleadas para la protección contra el daño celular que se produce durante los procesos de congelación, vitrificación y desvitrificación, debidos principalmente a la formación de cristales de hielo y a una deshidratación inadecuada. Los crioprotectores alteran las propiedades físico-químicas de las soluciones (Fernández *et al.*, 2013).

Los crioprotectores pueden clasificarse en dos tipos: permeables (intracelulares) y no permeables (extracelulares):

- 1) Permeables o intracelulares, tienen un peso molecular (PM) < de 90 Daltons (Da). Son crioprotectores de bajo PM y realizan su función entrando a la célula y reemplazando el agua intracelular, modificando sus características físico-químicas y su respuesta ante el descenso de la temperatura, entre ellos están: glicerol (G), etilenglicol (EG), propilén glicol (PG) y dimetilsulfóxido (DMSO), (Gordon, 1994; Izaguirre *et al.*, 2012).

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

Uno de los crioprotectores permeables usado frecuentemente es el EG, que tiene un peso molecular de 62.07 Da y además es un crioprotector de penetración rápida, que reduce el cambio de volumen y el tiempo de exposición para completar el equilibrio osmótico de los ovocitos. En alta concentración (más de 35%) o prolongada exposición (más de 1 minuto) produce daño excesivo de la membrana plasmática y reduce potencialmente el desarrollo embrionario posterior (Hotamisligil *et al.*, 1996).

2) No permeables o extracelulares, tienen un PM de $>$ de 240 Da. Son compuestos que normalmente se utilizan asociados a los crioprotectores intracelulares. Ejercen su efecto promoviendo una rápida deshidratación celular aumentando el gradiente osmótico y ayudando a la incorporación, por parte de las células, del crioprotector permeable durante la vitrificación. Se clasifican a su vez en dos tipos:

a) Bajo peso molecular: monosacáridos como la glucosa y galactosa y disacáridos como la sacarosa (azúcar común) y la trehalosa.

b) Alto peso molecular: polímeros como el PVA, polietilenglicol y Ficoll (Izaguirre *et al.*, 2012).

Estos crioprotectores son moléculas grandes y no pueden penetrar al interior de la célula, entre ellos se incluyen también el suero fetal bovino (SFB), la yema de huevo y la BSA.

La trehalosa es un crioprotector no permeable que tiene un peso molecular de 378.33 Da, es un disacárido natural formado por la unión de dos moléculas de glucosa, tiene características más favorables que otros azúcares para la estabilización de las proteínas y de la doble capa de fosfolípidos de las membranas biológicas (Corti, 2006). Tiene una acción protectora relacionada con el efecto osmótico y participa en interacciones específicas con los fosfolípidos de la membrana (Abe *et al.*, 2005), estabiliza la bicapa de lípidos de la membrana y ejerce una función protectora contra el frío (Conejo, 2003).

Para disminuir los efectos tóxicos (figura 1, Izaguirre *et al.*, 2012) de las soluciones de vitrificación, se emplean varias estrategias (Vajta, 2015):

1. Empleo de crioprotectores de baja toxicidad y alta permeabilidad: es el caso de EG, cuyo uso se ha extendido en prácticamente todas las especies.

2. La combinación de dos o tres crioprotectores. Estas asociaciones deben estudiarse previamente, para evitar que los agentes empleados muestren un efecto sinérgico y la toxicidad se multiplique. En el caso de los embriones bovinos, se ha dejado de usar el G y el DMSO para hacer uso del EG, sólo o en combinación con sacarosa o trehalosa, que ha demostrado ser menos tóxico (Dochi *et al.*, 1990), ya que la permeabilidad es superior a la de los componentes individualmente (Celestinos y Gatica 2002).
3. Adición de crioprotectores por pasos, en soluciones de concentración ascendente. Los métodos se centran en buscar el menor tiempo de exposición posible a los crioprotectores, dependiendo del estado de desarrollo de embrión.
4. Disminución de la temperatura durante la exposición del embrión a la solución final de vitrificación (concentración más elevada de crioprotectores). Este procedimiento podría ser útil pero existe el riesgo de que se produzcan lesiones por frío.

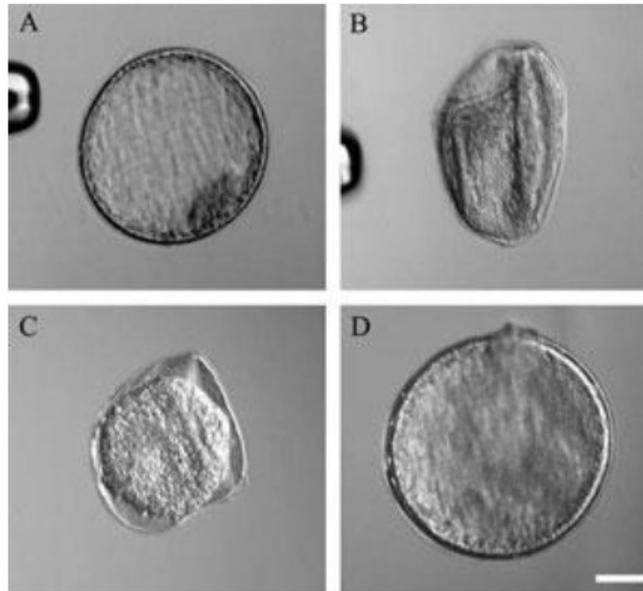


Fig. 1. Respuesta de un embrión bovino en etapa de blastocisto a la exposición a las soluciones de vitrificación. A: embrión en solución isosmótica. B: embrión en solución hiperosmótica, pierde agua intracelular por acción de los crioprotectores no permeables. C: entrada de crioprotectores permeables en el embrión. D: embrión con crioprotectores reemplazando el agua intracelular (Tomado de Izaguirre *et al.*, 2012).

2.3 Tipos de recipientes

Al momento de vitrificar, se ha dado mucha importancia al volumen de líquido en el que se encuentra el embrión, ya que cuando es menor, mayor será la eficiencia de la vitrificación. Los volúmenes menores permiten una mejor transferencia de calor, facilitando de esta forma la velocidad de enfriamiento más alta. Varias técnicas se han desarrollado para reducir el volumen de la muestra con una gran variedad de métodos que aparecen en la literatura durante los últimos años (Saragusty y Arav, 2011).

Las técnicas de vitrificación requieren de un recipientes, los más comúnmente usados son: pajillas de 0.5 ml (Gordon, 1994), pajillas de 0.25 ml (Kuwayama *et al.*, 2005), OPS de 1-1.5 μ L (Vajta *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2004), SOPS de 0.5-1.0 μ L (Isachenko, 2005), Cryolock <0.1 μ L (García *et al.*, 2011), Cryoloop 0.5 μ L (Lane *et al.*, 1999; Kawakami *et al.*, 2008), Cryotop <0.1 μ L (Kuwayama *et al.*, 2005; Nagashima *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008) y recientemente la BES 1-2 μ L (Fernández *et al.*, 2012). Para vitrificar a los embriones se requiere

aumentar la concentración de crioprotectores y esto aumenta su toxicidad, por lo que con los recipientes se trata de disminuir el volumen de medio de vitrificación y de esta forma aumentar la velocidad de enfriamiento para que sea lo más rápido posible y el cambio de temperatura en la zona de transición no ocasione daño a los embriones, lo cual se logra cuando el volumen de la solución de vitrificación es mínimo (Cuello *et al.* 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el desarrollo de las biotecnologías ha contribuido a la conservación de especies domésticas, junto a un interés económico enfocado en la conservación y multiplicación de recursos genéticos únicos que puedan estar disponibles con facilidad para su utilización, por lo cual es necesario promover el uso de biotecnologías que permitan aumentar la producción y reproducción de animales de alto valor genético y su conservación.

Aunque se han realizado diversas investigaciones enfocadas a la PIV de embriones, los resultados varían unos de otros. La PIV representa la base para la obtención de embriones que pueden ser transferidos a hembras receptoras o destinados a su criopreservación por medio de técnicas como la vitrificación. En la vitrificación de embriones bovinos producidos tanto *in vivo* como *in vitro*, aún no se ha documentado el uso de crioprotectores permeables como el EG y no permeables como la trehalosa en conjunto con el recipiente BES. Existe aún la necesidad de realizar protocolos de vitrificación de embriones bovinos, enfocados a disminuir el daño celular para obtener una mayor eficiencia en la viabilidad y en el potencial de desarrollo embrionario post-vitrificación; así como brindar opciones que disminuyan el costo en la aplicación de la técnica de vitrificación.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Será posible mantener la viabilidad y el potencial de desarrollo embrionario, de mórulas vitrificadas con los crioprotectores EG y trehalosa, en el recipiente BES?

5. HIPÓTESIS

Las mórulas de bovino producidas *in vitro* al ser vitrificadas con EG y trehalosa en BES, mantendrán su viabilidad y el potencial de desarrollo

6. OBJETIVOS

6.1 General

Determinar la efectividad del EG y la trehalosa en la BES para la vitrificación de mórulas de bovino producidas *in vitro*.

6.2 Particulares

- ❖ Producir embriones *in vitro* hasta el estadio de mórula y blastocisto.
- ❖ Evaluar la viabilidad de las mórulas después de su vitrificación con EG y trehalosa en BES.
- ❖ Evaluar el progreso de las mórulas desvitrificadas hacia el estadio de blastocisto.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Los medios de cultivo utilizados se prepararon con reactivos de grado cultivo celular de SIGMA Chemical Co. (St. Lois, MO, EUA) y diluidos en agua ultrapura Milli-Q, esterilizados mediante la filtración a través de membranas con poro de 0.22 μm para almacenarse en refrigeración a 5 °C. Todos los medios fueron suplementados 24 horas antes de su utilización, excepto el medio modificado amortiguado con Tris (mTBM) que se incubó 48 horas antes para su completo equilibrio. Los medios, ovocitos y embriones fueron incubados a 38.5 °C con 5% de CO₂ y la humedad a saturación.

7.1 Colección y maduración de los ovocitos

Los ovarios fueron colectados de hembras bovinas adultas sacrificadas en un rastro local, ubicado en el municipio de Temamantla, Estado de México. Una vez recuperado el aparato reproductor, se separaron los ovarios para limpiarlos con solución salina NaCl 0.157 M, suplementada con 75 mg/mL de penicilina G potásica y 50 mg/mL de sulfato de estreptomicina y se transportaron a una temperatura de 30-35 °C por un período menor a tres horas (Ahuja *et al.*, 2009; López *et al.*, 2007).

Una vez en el laboratorio, bajo condiciones asépticas, se procedió nuevamente a lavar tres veces los ovarios con solución salina para retirar el posible material contaminante (Urrego *et al.*, 2008). Para obtener los complejos ovocitos células del cúmulo (COCs) los folículos de 2 a 8 mm se aspiraron con una aguja hipodérmica de calibre 18 y una jeringa desechable de 10 mL. El líquido folicular fue recogido en un tubo cónico de 50 mL y se dejó reposar por 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en el medio de Tyrode modificado suplementado con 10 mM de lactato de sodio, 10 mM de HEPES, 0.1% de alcohol polivinílico (TL-HEPES-PVA) a un pH de 7.3 a 7.4 y heparina 200 UI/mL (PISA, México) (López *et al.*, 2007; Ahuja *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2013).

Los COCs seleccionados fueron los que presentaron citoplasma uniforme rodeado de una masa de células del cúmulo compactas y fueron lavadas tres

veces en gotas de 100 μ L de medio de maduración, TCM-199 con sales de Earle y bicarbonato de Sodio (In Vitro, México). Suplementado con PVA al 0.1%, D-Glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM y 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (Fernández *et al.*, 2013).

Una vez seleccionados los COCs se introdujeron a cajas de cultivo de 4 pozos conteniendo 500 μ L del medio de maduración suplementado con lo descrito anteriormente y se adicionó SFB al 10%, 0.5 μ g/mL de LH y 0.5 μ g/mL de FSH, los pozos fueron cubiertos con aceite mineral estéril, incubándose por 22 horas para su maduración (López *et al.*, 2007; Urrego *et al.*, 2008; Asgari *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013).

7.2 Cultivo de células del cúmulo

Se realizó un cultivo de células de cúmulo, colectándolas del medio que contenía las células de la granulosa, de las células precipitadas se tomaron 100 μ L y se colocaron en una caja Petri de 35X10 mm con 2 mL de TCM-199 suplementado con 20% de SFB, cubierto con aceite mineral para su incubación. Este cultivo se realizó siete días antes de comenzar el cultivo de los embriones (Soto *et al.*, 2014).

7.3 Fertilización in vitro

Los ovocitos madurados fueron lavados tres veces con el medio mTBM que consta de NaCl 113.1 mM, KCl 3.0 mM, CaCl₂ · 2H₂O 7.5 mM, Tris 20 mM, glucosa 11 mM y piruvato de sodio 5 mM, suplementado con 0.4% de BSA fracción V y 2.5 mM de cafeína. Posteriormente se depositaron de 10-20 COCs en pozos con 250 μ L de mTBM cubierto con aceite mineral estéril y se incubaron por 45 minutos hasta la inseminación (Fernández *et al.*, 2013).

Para la inseminación se utilizó semen congelado de la raza Holstein, descongelando una pajilla de 0.25 mL en agua a 37 °C por 1 minuto. Se utilizaron las muestras que tuvieron un mínimo de 70% de movilidad, diluyendo con 3 mL de PBS de Dulbecco (DPBS, Gibco, EE.UU.) suplementado con 0.1% de BSA fracción V, 75 mg/mL de penicilina G potásica y 50 mg/mL de sulfato de

estreptomycin a un pH de 7.2, posteriormente se centrifugó a 200 x g por 5 minutos y el sedimento se resuspendió en 250 μ L de mTBM, que fueron colocados en 2 mL de mTBM e incubados por 30-60 minutos, después se aspiraron 800 μ L de la parte superior y se procedió a hacer el conteo en una cámara de Neubauer. Una vez obtenida la concentración se diluyó la solución de los espermatozoides, para inseminar cada uno de los pozos con una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL, adicionando también 80 μ L de PHE (penicilamina 2 mM, 1 mM de hipotaurina y 250 mM de epinefrina en 0.9% (p/v) de NaCl) y 25 UI de heparina (PISA, México). Los ovocitos y los espermatozoides fueron co-incubados por 18 horas (López *et al.*, 2007; Ahuja *et al.*, 2008; Urrego *et al.* 2008; Fernández *et al.*, 2013, Hansen, 2014; Soto *et al.*, 2014).

Finalizado el periodo de co-incubación, los presuntos cigotos fueron removidos de los pozos de fertilización y se procedió a eliminar mecánicamente las células del cúmulo y los espermatozoides, posteriormente se lavaron tres veces en gotas de 100 μ L de medio SOFaa (Anexo 1), suplementado con 3 mg/mL de BSA fracción V (Hansen, 2014).

7.4 Evaluación de la MIV y FIV

Una vez lavados los supuestos cigotos se tomaron al azar 10 células para la evaluación de la maduración y el porcentaje de fertilización mediante la tinción de Hoechst, para esto se preparó una caja de 4 pozos colocando 300 μ L de una solución de Hoechst 33342 (40 μ g/mL) en un pozo y en los siguientes 500 μ L de mTBM para el lavado de los ovocitos post-tinción. Una vez colocados los embriones en la tinción se incubaron por 45 minutos, posteriormente se lavaron con mTBM en los siguientes pozos, se transfirieron a un portaobjetos con la menor cantidad de medio y se colocó una gota de 5 μ L de glicerol (3%), conservándose el portaobjetos en oscuridad y evaluándose posteriormente en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axiostar) a 400X.

Aquellos ovocitos que mostraron VG fueron considerados inmaduros, los que se observaron en la primera metafase (MI) se consideraron en proceso de maduración y los que se encontraban en la segunda metafase (MII) y/o cuerpo

polar se clasificaron como madurados (Casas *et al.*, 2010); la fertilización fue evaluada por la presencia de dos o más pronúcleos.

7.5 Evaluación del desarrollo embrionario

Los embriones fueron evaluados a los 3 días post-inseminación para valorar si su estadio de división correspondía con el tiempo de desarrollo esperado, posteriormente se volvieron a evaluar al día 5, 8 y 9 post-inseminación para la clasificación de acuerdo a los siguientes criterios: sin desarrollo, aquellos ovocitos no fertilizados. Los de 2 a 8 blastómeros se conjuntaron en un solo grupo y fueron considerados como embriones tempranos; aquellos con un número mayor de blastómeros fueron considerados como mórulas y los que presentaban una cavidad o blastocele y se consideraron blastocistos. Todos fueron evaluados mediante observación en un microscopio invertido (Olimpus Optical) 400X (Fernández *et al.*, 2013).

7.6 Desarrollo embrionario en el grupo 1 sin vitrificar

El desarrollo embrionario se realizó en gotas de 100 μ L de medio SOFaa suplementado con 3mg/mL de BSA Fracción V, colocando 10 supuestos cigotos en cada gota; el 50% del medio fue retirado cada 48 horas, sustituyéndolo por medio fresco con el fin de evitar la acumulación de sustancias embriotóxicas (Walter y Miller, 1996; De los Reyes *et al.*, 2003; Hansen, 2014).

En el grupo 1 sin vitrificar (grupo control) se desarrollaron hasta etapa de mórulas (día 5 post-inseminación) y posteriormente se cultivaron por 72 horas más para su desarrollo a blastocisto.

7.7 Evaluación de la viabilidad en las mórulas desvitrificadas (grupo 2A)

El grupo de mórulas del grupo 2A que se sometió al proceso de vitrificación fueron lavadas en medio TL-HEPES-PVA modificado y fueron colocadas en 200 μ L de 0.5 mg/mL de MTT (azul de tiazolil) diluido en mTBM. Después de 2 horas de incubación, se observaron con un microscopio óptico (Zeiss Axiostar) a 400X. Las mórulas que presentaron más del 50% del total de los blastómeros con un color púrpura fueron consideradas como viables (Mossman, 1983).

7.8 Evaluación de la viabilidad y el desarrollo embrionario post-vitrificación (grupo 2B)

En el grupo 2B las mórulas desvitrificadas fueron lavadas tres veces con medio SOFaa, eliminando con ello residuos del medio de desvitrificación, y se colocaron en pozos de cultivo para continuar su desarrollo hasta blastocito colocándolas en gotas de 100 μ L de medio SOFaa, evaluándolas transcurridas 72 horas de su desvitrificación (8 días post-inseminación) mediante el avance en el estadio de desarrollo embrionario, la formación de la cavidad del blastocelo y la expansión del blastocisto. Posteriormente se continuó con el cultivo por 48 horas más para determinar el porcentaje de eclosión (Palasz *et al.*, 1997).

7.9 Preparación de la pajilla con borde biselado (BES)

La preparación de las BES, consistió en cortar los bordes de las pajillas de 0.25 mL con unas tijeras muy finas, reduciendo lo más posible su diámetro. En el presente trabajo se estiró la BES para modificar el grosor por medio de su calentamiento en una placa térmica a 90 °C, posteriormente se cortó a un diámetro menor al anteriormente realizado (Fig. 2, A Y B). Esta diferencia en la BES estirada, disminuyó el volumen a <1 μ L así como también su grosor (Anexo 2.1). Las pajillas BES estiradas fueron esterilizadas en rayos ultra violeta (UV) por 1 hora (Anexo 2.2).

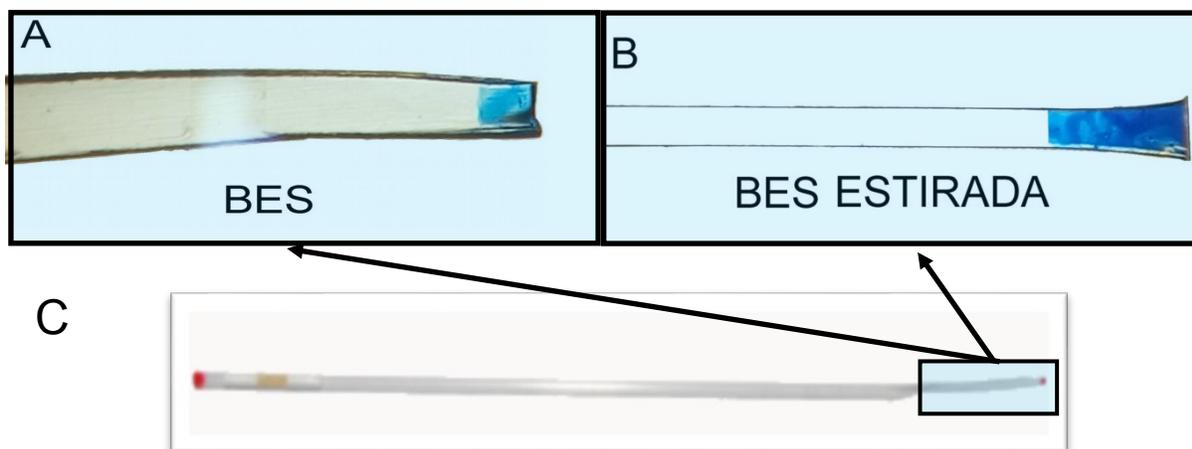


Fig. 2. Diferencias entre la BES y BES estirada. A. BES. B. BES estirada. C. recipiente BES.

7.10 Vitricación de mórulas

El procedimiento de vitricación de mórulas se realizó siguiendo la metodología empleada por Fernández *et al.*, (2013); con las siguientes soluciones:

Solución 1: TCM-199-Hepes suplementado con 20% de SFB.

Solución 2: TCM-199-Hepes suplementado con 20% de SFB + 4% de EG.

Solución 3: TCM-199-Hepes suplementado con 20% de SFB + 35% de EG + 0.4 M de trehalosa.

Una vez preparadas las soluciones se procedió a filtrarlas para su esterilización e introducir las a la incubadora para su equilibrio por un tiempo de 2 horas.

Pasadas las 2 horas de equilibrio las mórulas fueron lavadas tres veces con la solución 1 con el fin de eliminar la mayor parte del medio de desarrollo. Ya limpios los embriones se transfirieron a la solución 2 donde permanecieron por un lapso de 12 a 15 minutos, posteriormente se pasaron a la solución 3 durante 1 minuto; finalmente se colocaron las mórulas sobre las BES, con la menor cantidad de medio (<1 μ L) y siendo inmediatamente introducidas al NL, finalmente se colocaron en el contenedor previamente fabricado por un periodo de 15 días antes de su desvitricación (Fernández *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013).

7.11 Desvitrificación de las mórulas

Para la desvitrificación de las mórulas se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución 1: TCM-199-Hepes suplementado con 20% de SFB + 0.3 M de trehalosa.

Solución 2: TCM-199-Hepes suplementado con 20% de SFB + 0.2 M de trehalosa.

Solución 3: TCM-199-Hepes suplementado con 20% de SFB + 0.1 M de trehalosa.

Solución 4: TCM-199-Hepes adicionado con 20% de SFB.

Las soluciones se incubaron para su equilibrio por 2 horas. Posteriormente, las mórulas se removieron del NL y se colocaron rápidamente en la solución 1 durante 2 minutos, posteriormente se pasaron a las soluciones 2 y 3 durante 2 minutos en cada uno, posteriormente se lavaron en la solución 4

7.12 Diseño experimental

Los complejos ovocitos-células del cúmulo COCs fueron obtenidos de folículos ováricos de 2-8 mm de diámetro en el medio TL-HEPES-PVA. Después de su colecta fueron lavados y madurados en medio TCM-199 y se incubaron por 22 horas. Después de la MIV, se realizó el lavado y la inseminación de los COCs en medio mTBM con espermatozoides descongelados y seleccionados por “swim up”, la co-incubación se realizó por 18 horas. Para evaluar los porcentajes de MIV y FIV se seleccionaron algunos para su tinción con Hoechst. Posteriormente se realizó la denudación por separación mecánica de los supuestos cigotos, lavándolos e incubándolos en SOFaa para su desarrollo embrionario, dividiéndolos en dos grupos:

1. Grupo 1 sin vitrificar (grupo control): Se cultivaron 95 supuestos cigotos para su desarrollo y de las mórulas obtenidas en el día 5 post-inseminación, se continuó su cultivo hasta el estadio de blastocisto (~día 8 post-inseminación).

2. Grupo 2 para vitrificación: se cultivaron 421 supuestos cigotos, dividiéndolos en los siguientes dos grupos:

2A. En este grupo se incluyeron 217 supuestos cigotos para su desarrollo. Las mórulas fueron mantenidas en vitrificación por 15 días. Inmediatamente después de su desvitrificación fueron sometidas a tinción para determinar el porcentaje de viabilidad.

2B. En este grupo se cultivaron 204 supuestos cigotos para su desarrollo a mórulas, las cuales fueron mantenidas por el mismo periodo en vitrificación. Las mórulas desvitrificadas fueron cultivadas para su desarrollo a estadio de blastocisto (72 horas post-vitrificación) y por 48 horas más para su eclosión.

7.13 Análisis estadístico

Los datos de desarrollo embrionario a blastocisto obtenidos en el desarrollo en el grupo de mórulas no vitrificadas (control) fueron analizados mediante la prueba de independencia de chi-cuadrada con un intervalo de confianza de $P < 0.05$. El desarrollo de blastocistos en el cultivo sin vitrificar fueron comparados con el desarrollo post-desvitrificación por medio de la prueba de dos proporciones con un intervalo de confianza de $P < 0.05$ (Kuehl, 2001).

8. RESULTADOS

De los ovarios colectados en el rastro, se seleccionaron 678 COCs, los cuales fueron sometidos a la MIV, tomando 84 de ellos para la evaluación del porcentaje de MIV. Los 594 ovocitos restantes fueron inseminados para su FIV y posteriormente se seleccionaron 78 para la evaluación; quedando un total de 516 ovocitos inseminados.

8.1 Maduración *in vitro*.

De los 84 COCs seleccionados para la evaluación de la MIV, 74 estuvieron en estadio de MII; lo que significa un 88% de maduros, sólo el 12% restante se clasificó como inmaduros y en vías de maduración, (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados obtenidos en la maduración de ovocitos *in vitro* durante la producción de embriones bovinos.

VESÍCULA GERMINAL (VG)	METAFASE I (MI)	METAFASE II + CP (MII)
(%)	(%)	(%)
3/84	7/84	74/84
(3.5)	(8.3)	(88.0)

VG. Inmaduros
MI. En vías de maduración
MII. Maduros

8.2 Fertilización *in vitro*.

De los 594 ovocitos que fueron inseminados, se tomaron 78 presuntos cigotos para evaluar la FIV, obteniendo un 87.1% de fertilización, de ellos sólo 2 presentaron al menos 3 pronúcleos, por lo que se clasificaron con polispermia (2.9%), (fig. 3). De los ovocitos que fueron clasificados como no fertilizados, la mayoría se encontraba en MII (10.2%), Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de la Fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos.

NO FERTILIZADOS			FERTILIZADOS	
VG	MI	MII	1 o más Pronúcleos+ 2 CP	Polispérmicos
(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2/78	0/78	8/78	68/78	2/68
(2.5)	(0.0)	(10.2)	(87.1)	(2.9)

Fertilizados = 2 o más PN + 2 CP

Polispérmicos = > 2 PN + 2 CP

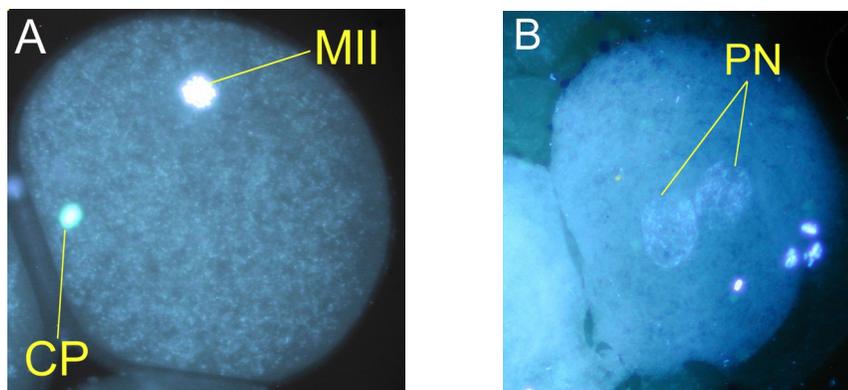


Figura 3. Evaluación de la MIV y FIV por medio de la tinción con Hoechst (400X). A: Ovocito en estadio de metafase II con cuerpo polar. B: Ovocito fertilizado con dos pronúcleos (PN) visibles.

8.3 Producción de embriones no vitrificados y desarrollados hasta blastocistos (grupo control).

En el grupo 1 sin vitrificar (grupo control) se seleccionaron 95 supuestos cigotos para evaluar el desarrollo, cultivándose hasta el estadio de blastocisto. El porcentaje de división embrionaria fue de 73.6%, quedando la mayoría de ellos en estadios de 2-8 células y un 32.8% de blastocistos de (fig. 4). De las 36 mórulas observadas el día 5 post-inseminación, 23 de ellas prosiguieron su desarrollo hasta blastocisto; quedando una relación blastocistos/mórulas de 23/36, tabla 3.

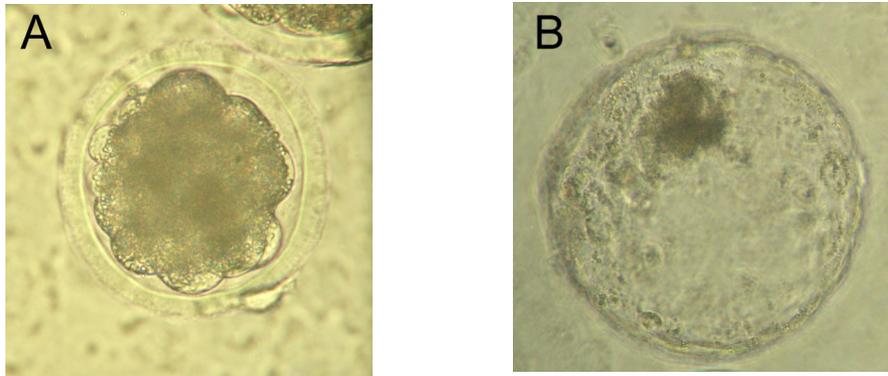


Fig 4. Desarrollo de embriones sin vitrificar hasta estadio de blastocistos. A: mórula obtenida al día 5 post-inseminación (400X). B: blastocistos al día 8 post-inseminación (200X).

Tabla 3. Producción de embriones *in vitro* no vitrificados.

Total de Ovocitos Inseminados	Divididos/total (%)	Desarrollo embrionario			
		2-8 Células/ Divididos (%)	Mórulas/ <u>Dividos</u> (%)	Blastocistos/ Divididos (%)	Relación blastocistos/ mórulas* (%)
95	70/95 (73.6%)	34/70 (48.5)	13/70 (18.5)	23/70 (32.8)	23/36 (63.8)

* Porcentaje de blastocistos entre el total de mórulas observadas al día 5 post-inseminación.

8.4 Viabilidad de las mórulas desvitrificadas.

En el grupo 2A se seleccionaron 217 supuestos cigotos, de los cuales sólo el 27.1% presentaron división; sin embargo, el 50% de los embriones desarrollados llegaron a estadio de mórula (fig. 5); éstas se vitrificaron y después de su desvitrificación se obtuvo un 38.7% de viabilidad (Tabla 4).

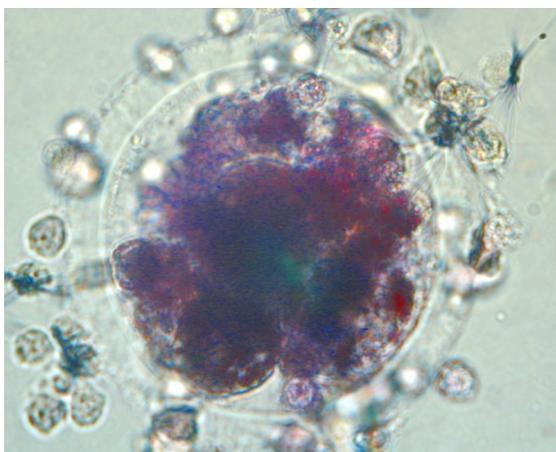


Figura 5. Tinción con MTT. (400X). Mórula desvitrificada con todos los blastómeros viables.

Tabla 4. Viabilidad de las mórulas vitrificadas en BES con EG y trehalosa

Total de Ovocitos Inseminados	Divididos/ Inseminados (%)	Desarrollo embrionario		
		Mórulas/ Divididos (%)	Embriones vitrificados	Viabilidad* Embriones vivos/vitrificados (%)
217	59/217 (27.1)	31/59 (52.5)	31	12/31 (38.7 %)

* Embriones teñidos al 50% o más fueron clasificados como viables

8.5 Desarrollo de blastocistos a partir de las mórulas desvitrificadas.

De un total de 204 ovocitos incluidos en el grupo 2B, el 66.6% tuvo división embrionaria; llegando 68 a estadio de mórula, las cuales se vitrificaron. El desarrollo embrionario de las mórulas posterior a la desvitrificación, fue de 27.9% y todas ellas alcanzaron el estadio de blastocisto (fig. 6), llegando a eclosionar el 47.3%, (Tabla 5).

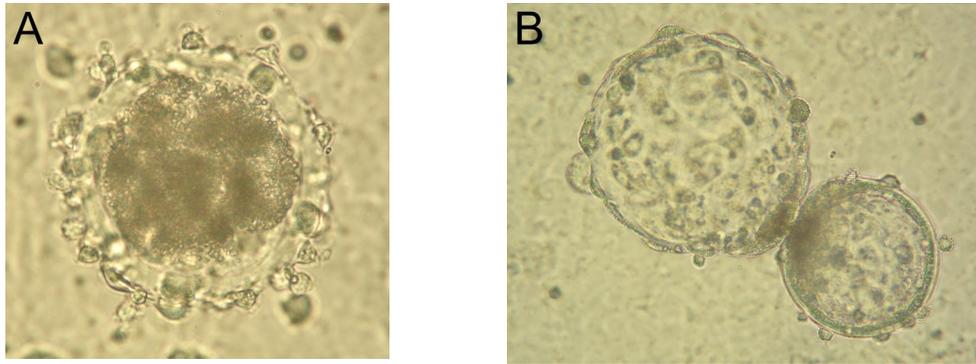


Fig 6. Desarrollo embrionario de las mórulas desvitrificadas. A: Mórula desvitrificada (400X). B: Blastocisto obtenido post-desvitrificación (200X).

Tabla 5. Desarrollo de las mórulas desvitrificadas hasta alcanzar la etapa de blastocisto.

Total de ovocitos inseminados	Divididos/ inseminados	Mórulas/ divididos	blastocistos/ mórulas desvitrificadas	*eclosión de blastocistos desarrollados post-vitrificación
204	136/204 (66.6%)	68/136 (50.0%)	19/68 (27.9%)	9/19 (47.3%)

* La Tasa de eclosión se determinó a partir del total de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto.

El total de blastocistos obtenidos de los embriones desarrollados sin vitrificar fueron comparados con los obtenidos en las mórulas desvitrificadas, no encontrando diferencias significativas ($P > 0.05$), aunque el daño causado durante el proceso de vitrificación y desvitrificación disminuyó el porcentaje de blastocistos obtenidos a partir de las mórulas desvitrificadas, el desarrollo embrionario después de la vitrificación fue favorable.

El porcentaje de blastocistos obtenidos del grupo de mórulas no vitrificadas se comparó con el obtenido en las mórulas desvitrificadas, encontrando diferencias significativas entre estas dos proporciones ($P < 0.05$), siendo mayor el desarrollo en los embriones no vitrificados.

9. DISCUSIÓN

En la PIV de embriones bovinos, se ha demostrado que no todos los ovocitos que son sometidos al proceso de MIV son aptos para alcanzar la metafase II. En el presente estudio un 88% de los ovocitos fueron clasificados en metafase II (madurados), siendo un porcentaje comparable a los obtenidos por Asiye y Ozen (2015) y Córdoba, (2010); con 88.1% y 89.7% de maduración. Kane (2003), también menciona un 90%. Ordoñez *et al.*, (2014) informa hasta 94.7% y 93.2% de MIV cuando se suplementa el medio de maduración con: 10% de SFB y 10% suero de vaca en estro (SVE) respectivamente.

El porcentaje de fertilización obtenido (87.1%) fue similar al 84% reportado por Soto, (2014) en condiciones y medios idénticos a los utilizados en el presente estudio, mientras que Fukui *et al.*, (1991) reportan un 85%, al utilizar el medio TALP y someter los espermatozoides descongelados a una capacitación previa con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de heparina por 15 minutos. Un menor porcentaje reportan Lonergan *et al.*, (2006) y Mucci *et al.*, (2006), quienes indican que en condiciones *in vitro*, el 80% de los ovocitos son fertilizados. Mientras que Goto *et al.*, (1988) reportan un 63% de fertilización, en el medio Brackett & Oliphant (BO) en presencia de 5 mg/mL de BSA y 2.5 mM de cafeína, al co-incubar los gametos por un periodo de 6 horas.

Respecto a la polispermia, sólo el 2.9% de los ovocitos fertilizados tuvieron 3 ó más pronúcleos, que es un valor menor a lo reportado por Fukui *et al.*, (1991) quienes encontraron una incidencia de 13% en el medio BO en una concentración de $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ y Fukui y Ono (1989), 11%, en medio TALP con la misma concentración. El bajo porcentaje de polispermia obtenido en este estudio, podría atribuirse a que los protocolos de fertilización son distintos entre sí, ya que en este protocolo se emplea el medio mTBM junto con factores de motilidad espermáticos; conocidos como PHE (Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina), además de una concentración espermática de $1 \times 10^6/\text{mL}$, dando como resultado una disminución importante de la incidencia de polispermia.

Una baja cantidad de los ovocitos inseminados no fueron fertilizados, ya que 2.5% se encontraron en etapa de VG y no pueden ser fertilizados, por no tener las condiciones necesarias para que se lleve a cabo en ellos la fertilización. Por otra parte hubo ovocitos en metafase II que no fueron fertilizados, representando el 10.2%. Una de las posibles causas puede explicarse al analizar lo propuesto por Segura *et al.*, (2015), quienes mencionan que cuando los ovocitos provienen de folículos de mayor diámetro (8 mm), pueden extraerse ovocitos en estado de degeneración, limitando su capacidad de fertilización, por otra parte se dice que los ovocitos provenientes de folículos de 5 mm poseen mejores porcentajes de MIV, FIV y producción de blastocistos (Gonella *et al.*, 2013).

En el grupo control, los embriones destinados para el desarrollo a estadio de blastocisto en mórulas sin vitrificar, la división embrionaria fue del 73.6%, que es similar a lo reportado por Block *et al.*, (2009) con un 77.3%, al cultivar en grupos de 10-15 cigotos en microgotas de 25 μ L de medio SOFaa suplementado con BSA (4 mg/mL), mientras que Ahumada *et al.*, (2013), utilizaron el medio SOFaa con 3 mg/mL de BSA y cultivaron grupos de 30 a 50 cigotos en pozos de 500 μ L y 5 cigotos en microgotas de 50 μ L, encontraron un 76.2% en los pozos y 79.6% en las microgotas. Shirazi *et al.*, (2009), obtuvieron un 74.6% de división embrionaria al cultivar en medio SOFaa y un 75.3% al poner en desarrollo en presencia de monocultivo de células oviductuales. El volumen de las gotas de cultivo utilizados en el presente trabajo (100 μ L) fue el adecuado al permitir una división de los embriones similar a la obtenida por otros autores.

En el presente estudio un 48.5% de embriones, detuvo su desarrollo en estadio de 2-8 células, este arresto en estadios tempranos concuerda con lo observado por Antunes *et al* (2010), quienes reportan un 56.8% de arresto embrionario en estadios de 2-16 células. Los embriones arrestados presentaron núcleos con condensación de la cromatina y fragmentación, siendo altamente susceptibles a la apoptosis (Antunes *et al.*, 2010).

En el presente estudio en el grupo sin vitrificar, el porcentaje de mórulas (18.5) fue comparable a lo obtenido por Ferguson *et al.* (2012), quienes utilizaron el medio CR1aa-BSA y reportan 22% al incluir 15 ng/mL de progesterona al medio y 33% en su grupo control (sin progesterona), también corresponde con lo mencionado por Asgari *et al.*, (2012); quienes al utilizar el medio SOF obtuvieron 21% y 19% de mórulas tardías en los días 8 y 9 post-inseminación, lo cual indica que los medios de cultivo utilizados pueden influir en el desarrollo embrionario *in vitro*.

El porcentaje de blastocistos es comparable con lo reportado por Aziye y Ozen (2015), en el medio SOF con un 33.4% y en CR1 con un 28.9%, cultivando en microgotas de 100 μ L (20-30 embriones/gota), mientras que Ahumada *et al.*, (2013), en el medio SOFaa obtuvieron un 29.7% de blastocistos totales, cultivando en pozos de 500 μ L (30-50 embriones/pozo) y un 17.6% cultivando en microgotas de 50 μ L (5 embriones/gota). Por otra parte Moreno *et al.*, (2015) y Shirazi *et al.* (2009) reportan 30.3% y 31.1% respectivamente al cultivar en medio SOF en microgotas de 30 μ L (20-23 embriones/gota). Pahuara y Naveros (2014) investigaron el desarrollo embrionario en medio SOF (25 embriones/500 μ L) y KSOM (10 embriones/50 μ L), resultando un 40.9% y 31.7% de blastocistos. La mayoría de los resultados obtenidos concuerda con lo mencionado por Lopera *et al.*, (2016) quienes de forma teórica mencionan que en condiciones *in vitro* se ha evidenciado un porcentaje de blastocistos, que varía entre 30-40%, siendo afectado por las condiciones subóptimas de cultivo embrionario. Sin embargo, Ferguson *et al.*, (2012) reportan un 71% de blastocistos al suplementar el medio CR1 con 15 ng/mL de progesterona (P4) después del día 3 de desarrollo, demostrando que la P4 tiene un efecto positivo en el desarrollo de embriones bovinos desarrollados *in vitro*, si es adicionada al medio de cultivo en el día 3 post-inseminación y a concentraciones fisiológicas (10 ng/mL).

En el presente estudio se obtuvo un 38.7% de viabilidad al utilizar la BES en la especie bovina. El uso de este recipiente utilizado por Fernández *et al* (2012), indican que la vitrificación usando EG y trehalosa como crioprotectores, permite la

recuperación y viabilidad de los embriones al momento de su desvitrificación, habiendo obtenido una viabilidad de 51.5 y 55% en las especies ovina y porcina respectivamente. Esto demuestra que la BES puede ser utilizada en la vitrificación de estas especies.

La pajilla BES representa una opción para mantener viables los embriones vitrificados, al ser de fácil acceso y bajo costo, incluso de diez hasta cien veces menor del precio de otros recipientes comerciales como la SOPS y el Cryotop respectivamente. Lo anterior permite que sea costeable la vitrificación de un solo embrión por recipiente, permitiendo una mayor rapidez al momento de la aplicación de la técnica (Fernández *et al* 2012; Fernández *et al* 2013).

El uso de EG y trehalosa como crioprotectores de los embriones bovinos, representan una opción aceptable debido a que se ha visto que el EG es uno de los crioprotectores menos tóxicos al ser un crioprotector natural, además de que tiene una rápida capacidad de difusión a través de la membrana plasmática, mientras que la trehalosa protege a la célula de la deshidratación, además de jugar un importante papel en el proceso de desvitrificación, al impedir un excesivo movimiento del agua, la hinchazón y la ruptura de la célula (Corti, 2006).

La viabilidad de los embriones desvitrificados es uno de los parámetros más utilizados para determinar la eficiencia del protocolo de vitrificación, para lo cual se han utilizado diversos métodos para determinarla como son la tinción y la evaluación de la reexpansión de los blastómeros en el caso de embriones vitrificados en estadio de blastocisto. Sin embargo, se ha visto que la evaluación por medio de la reexpansión tiene algunas deficiencias al compararlo con el método de tinción, puesto que en el proceso de vitrificación y desvitrificación algunas células pueden ser afectadas por el movimiento del agua, provocando una hinchazón y ruptura de la membrana, obteniendo falsos positivos en los resultados (Corti, 2006).

La viabilidad obtenida en este estudio fue menor a los porcentajes de sobrevivencia de mórulas bovinas desvitrificadas reportadas por Dhali *et al.*,

(2011), quienes han obtenido porcentajes de 57.3 al 75.7%, dependiendo de la presencia de factores de crecimiento que benefician el desarrollo de los embriones para alcanzar las etapas de blastocistos tardíos y eclosión, además de mejorar su calidad.

Hlavicová *et al.* (2010), han reportado que los embriones en estadio de mórula son más sensibles a la vitrificación que los blastocistos. Sin embargo una de las formas para determinar el potencial de desarrollo de los embriones sometidos al proceso de desvitrificación, es por el cambio a un estadio posterior de desarrollo. En el presente trabajo el 63.8% de las mórulas desarrolladas sin vitrificar llegaron a estadio de blastocisto (relación mórula-blastocisto, tabla 3), mientras que en las mórulas que fueron sometidas al proceso de vitrificación el 27.9% llegó a blastocisto. Estos porcentajes son similares a los reportados por Asgari *et al.*, (2012), quienes reportan un desarrollo a blastocistos en mórulas sin vitrificar de 55% y de 35% en mórulas sometidas a la vitrificación en Cryotop. Dhali *et al.*, (2011) reportan porcentajes de 60.4% de blastocistos en mórulas desarrolladas sin vitrificar y en mórulas que fueron vitrificadas en pipetas obtuvieron un 44.7%. En el presente estudio, el progreso de un estadio a otro confirma la viabilidad de las mórulas.

El porcentaje de eclosión de blastocistos en las mórulas desvitrificadas fue de 47.3%, siendo mayor al 28.2% de eclosión en las mórulas obtenidas al día 4 post FIV y desvitrificadas reportado por Dhali *et al.*, (2011). Mientras que Asgari *et al.* (2012), reportan de 14 a 30% de eclosión en mórulas desvitrificadas. En estudios realizados con embriones vitrificados en estadio de blastocistos de 7 días de desarrollo embrionario; Rodríguez *et al.* (2012), reportan un 59% de eclosión, mientras que Shirazi *et al.* (2009), obtienen un 73.1% de eclosión al desarrollar los blastocistos desvitrificados y cultivados en el medio SOF en presencia de un monocultivo de células oviductuales (OCM), mientras que usando únicamente medio SOF reportan una eclosión del 30.5%, demostrando que existe un incremento del porcentaje de eclosión en blastocistos desvitrificados, cuando son cultivados en presencia de OCM. De lo anterior se puede concluir que el sistema

de cultivo embrionario aplicado después de la vitrificación, influye en la capacidad de desarrollo embrionario y su eclosión.

Dentro de los recipientes utilizados en la vitrificación de embriones en estadio de blastocisto, se reporta un porcentaje de eclosión a las 72 horas de un 27.5% en el recipiente OPS y 18.9% en capilares de vidrio (Ríos *et al.*, 2010); Gómez *et al.*, (2008) reportan porcentajes de eclosión de 40.1% y 16.7% en embriones vitrificados en el recipiente pajilla estirada (“pulled straw”) y observaron que en blastocistos vitrificados el día 8 son más susceptibles a la criopreservación que los de 7 días. Por último Kim *et al* (2012) vitrificaron blastocistos, reportando una eclosión de 64.7% en la rejilla de microscopio electrónico (electron microscope grid; EMG), 46.7% en la pajilla y 73.0% en el “paper container”; determinando que existe una variación en el porcentaje de embriones eclosionados, dado en parte por el recipiente utilizado para su vitrificación.

En este estudio el mayor porcentaje de blastocistos se obtuvo en los embriones desarrollados sin vitrificar, encontrándose diferencia significativa ($P < 0.05$) con los desarrollados a partir de mórulas desvitrificadas, sin embargo los resultados obtenidos en este estudio se consideran positivos ya que a pesar de haber sometido las mórulas al proceso de vitrificación y desvitrificación, se logró obtener un cambio en el desarrollo, al pasar de estadio de mórula a blastocisto; incluso logrando eclosionar varios embriones. Lo anterior es importante tomando en cuenta que el recipiente utilizado es uno de los más económicos y brinda la posibilidad de aplicar la técnica de vitrificación con la ventaja de ser de fácil fabricación y disponibilidad en cualquier unidad de producción donde se quiera aplicar la vitrificación de embriones. El cultivo de las mórulas vitrificadas con EG y trehalosa en BES permitió el progreso de las mórulas hasta blastocisto y eclosión, lo anterior permite suponer que las mórulas desvitrificadas pueden ser transferidas a hembras receptoras y obtener crías vivas.

10. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se determinó que los embriones de bovino producidos *in vitro* en estadio de mórula, pueden ser vitrificados mediante la utilización del EG y la trehalosa como crioprotectores, en el recipiente BES; manteniendo la viabilidad, capacidad de desarrollo a blastocisto y eclosión de los embriones.
- La pajilla BES es un recipiente de fácil acceso y disponibilidad con el cual se demostró que se pueden vitrificar mórulas que conserven su viabilidad y la posibilidad de desarrollarse a blastocistos de buena calidad.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Abe Y., Hara K., Matsumoto H., Kobayashi J., Sasada H., Ekwall H., Rodríguez M.H., Sato E. 2005. Feasibility of a nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol. Reprod.* 72: 1416-1420.
2. Ahuja C, Montiel F, Pérez P., Gallegos J. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootec Trop.* 27: 277-284.
3. Ahumada C.J., Salvador I, Cebrian S.A., Lopera R, Silvestre M.A. 2013. Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on *in vitro* embryo development and quality. *Animal* 7 (3): 455-462.
4. Alberio R. 1999. Producción *in vitro* de embriones bovinos. Grupo de biotecnología de la reproducción, INTA. Disponible en www.producción-animal.com.ar consultada el día 05-05-2015.
5. Antunes G., Chaveiro A., Santos P., Marques A., Jin H.S., Moreira S. 2010. Influence of apoptosis in bovine Embryo's development. *Reprod. Dom. Anim.* 45: 26-32.
6. Asgari V., Hosseini S.M., Forouzanfar M., Hajian M. y Nasr-Esfahani M.H. 2012. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: Effects of embryonic block and development kinetics. *Cryobiology.* 65: 278-283.
7. Asiye I.S., Ozen B.O. 2015. Vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos matured in modified TCM-199 medium. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 39: 688-692.
8. Brackett B.G, Bousquet D., Boice M.L. Donawick W.J., Evans J.F., Dressel M.A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147-158.

9. Block J., Bonilla L., Hansen P.J. 2009. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology* 71: 1063-1071.
10. Blondin P. 2015. Status of embryo production in the world. *Anim. Reprod.* 12 (3): 356-358.
11. Caamaño J.N., Gómez E., Trigal B., Muñoz M., Carrocera S., Martín D., Díez C. 2015. Survival of vitrified *in vitro*-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology* 83: 881-890.
12. Casas, E. Bonilla E., Ducolomb Y. Betancourt M. 2010. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Toxicology in Vitro* 24: 224- 230.
13. Casillas F. 2014. Efecto de las células del cúmulo en la viabilidad, maduración, fertilización y desarrollo embrionario después de la vitrificación de ovocitos inmaduros porcinos *in vitro*. Tesis. Maestría en Biología de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México D.F.
14. Casillas F., Tetetitla M.S., 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.
15. Castañeda M. L. 2009. Fisiología de la reproducción bovina: desde la fecundación hasta la implantación embrionaria. Tesis. Licenciatura en M.V.Z. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.
16. Celestinos M. y Gatica R. 2002. Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. *Arch. Med. Vet.* 34 (2): 157-165.

17. Conejo, N.J. 2003. Estado funcional de la membrana, capacitación *in vitro*, reacción acrosomal y capacidad de fertilización *in vitro* de espermatozoides porcinos almacenados en un diluyente de larga duración. Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F.
18. Córdoba V.B.L. 2010. Estrategias de cultivo para optimizar la maduración *in vitro* de ovocitos de terneras prepúberes. Tesis. Doctorado en Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
19. Corti, R.H. 2006. Criopreservación...¿y después? Soluciones acuosas sobreenfriadas y vitrificadas. Rev. Cienc. Hoy 15: 26-39.
20. Cuello, C., Gil, M.A., Parrilla, I., Tornel, J., Vázquez, J.M., Roca, J., Berthelot, F., Martinat-Botté, F., Martínez, E.A. 2004. *In vitro* development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. Theriogenology 62: 1144-1152.
21. De los Reyes M., Stuardo J. y Rodríguez BC. 2003. Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario bovino *in vitro*. Vet Méx. 24: 389-395.
22. Dhali A., Vahida M.A., Steve P.B., Isis K.M., Ronald E.P., Frank C.G. 2011. Development and quality of bovine embryos produced *in vitro* using growth factor supplemented serum-free system. Open J. Anim. Sci. 1 (3), 97-105.
23. Do V.H, Walton S., Taylor R.A.W. 2014. Benefits and constraints of vitrification technologies for cryopreservation of bovine *in vitro* fertilized embryos. J. of Vet. Sci. Anim. Husb. 2 (4).
24. Dochi O., Takakura H., Imai K. 1990. Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification. Japanese J. of Anim. Repr. 36, 69-72.
25. Ferguson C.E., Kesler D.J., Godke R.A. 2012. Progesterone enhances *in vitro* development of bovine embryos. Theriogenology 77: 108-114.

26. Fernández R.F., Ducolomb Y., Romo S., Casas E., Salazar Z. y Betancourt M. 2012. Viability maturation and embryo development *in vitro* of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology* 64: 261-266.
27. Fernández R.F., Hernández P.J.E., Romero R.J.G., Rodríguez S.J.L. 2013. Viabilidad después de la vitrificación de embriones de cerda y oveja producidos *in vitro*. *Rev. Salud Anim.* 35 (1): 52-58.
28. Fernández T.A. (2003). Dinámica folicular: Funcionamiento y regulación. Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23-ondas_foliculares.htm. Consultada el 22-Marzo-2016
29. Fukui Y., McGowan L., James R., Pugh P., Tervit H.. 1991. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fert* 92: 125-131.
30. Fukui Y., Ono H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fert.* 86: 501-506.
31. Garcia J.I., Noriega P.L., Noriega H.L. 2011. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Hum Reprod.* 26: 782-790.
32. Gigli, I., Russo A., Agüero A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet (B. Aires)*, 8 (1): 183-204.
33. Gómez E., Rodríguez A., Muñoz M., Caamaño J.N. 2008. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocyst to vitrification. *Theriogenology* 69: 1013-1021.

34. Gonella D.A.M., Atuesta B.J.E., Bernal U.S.M., Chacón J.L. 2013. Overview of the production of bovine embryos *in vitro*. Rev. Inv. Agr. Y Amb. 4 (1): 65-80.
35. Gordon I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International. Wallingford. Oxon, UK.
36. Goto K., Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. J Reprod Fert. 83: 753-758.
37. Guerra R., Solis A., Sandoya G., Armas R. 2012. Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos *in vivo* e *in vitro*. Rev. Electrón. Vet. 13: 10.
38. Hansen P.J. 2014. Procedures for *in vitro* production of bovine embryos. Dep. of animal sciences, University of Florida.
39. Hlavicová J., Lopatárová M., Cech S. 2010. Effect of two-step vitrification on developmental competence of *in vitro* an *in vivo* produced bovine embryos. Acta Vet. Brno. 79: s55-s61.
40. Henrique M., Garziera B., Braga V., Pedrotti M., Ferreira R., Francisco de Oliveira P., Bayard P., Bordignon V. 2012. Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. Experimental Cell Res. 318: 2049-2058.
41. Herradón P.G., Quintela L.A., Becerra J.J., Ruibal S., Fernández M. 2007. Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15 (1): 33-40.
42. Hirayama H., Moriyasu S., Kageyama S., Sawai K., Takahashi H., Geshi M., Fujii T., Koyama T., Koyama K., Miyamoto A., Minamihashi A. 2014.

- Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. *Theriogenology* 81: 1108-1115.
43. Hotamisligil, S., Toner, M., Powers, D. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod.* 55: 161-168.
 44. Isachenko V., Montag M., Isachenko E., Zaeva V., Krivokharchenki I., Shafei R., Vander Ven H. 2005. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum. Reprod.* 20: 492-496.
 45. Izaguirre F.E. y Monforte C.D. 2012. Adaptación de un método de vitrificación/calentamiento en fiberplug para la transferencia directa de blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Tesis. Master universitario en Biología y tecnología de la reproducción. Universidad de Oviedo. España.
 46. Kane M.T. 2003. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Anim. Reprod. Sci.* 79: 171-190.
 47. Kawakami M., Kato Y., Tsunoda Y. 2008. The effects of time of first cleavage, developmental stage, and delipidation of nuclear-transferred porcine blastocysts on survival following vitrification. *Anim. Reprod. Sci.* 106: 402-411.
 48. Kim Y.M., Uhm S.J., Gupta M.K., Yang J.S., Lim J.G., Das Z.C., Heo Y.T., Chung H.J., Kong I.K., Kim N.H., Lee H.T., Ko D.H. 2012. Successful vitrification of bovine blastocyst on paper container. *Theriogenology* 78: 1085-1093.
 49. Kruip T.A., Boni R., Wurth Y.A., Roelofsen M.W., Pieterse M.C. 1994. Potential use of *ovum* pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42: 675-684.

50. Kuehl R.O. 2001. Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. 2ª ed. Thomson Learning. México, D.F.
51. Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S.P. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 11: 300-308.
52. Lane M., Scholcraft W.B., Gardener D.K. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.* 72: 1073-1078.
53. Liu Y., Du Y., Lin L., Li J., Kragh P.M., Kuwayama M., Bolund L., Yang H., Vajta G. 2008. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and cryotop vitrification for cryopreservation of *in vitro* matured pig oocytes. *Cryo Letters* 29: 315-320.
54. Lonergan P., Fair T., Corcoran D., Evans A.C.O. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65: 137-152.
55. Lopera VR, Meriem H, Fernández FB, Maillo V, Beltrán BP, Calle A, Redruello A, López MS, Gutierrez AA, Yañez MM, Ramírez MA, Dimitrios R. 2016. Extracellular vesicles from BOEC in *in vitro* embryo development and quality. *PLoS ONE* 11 (2): 1-23.
56. López A., Olivera M., Ruiz T., Tarazona A. 2007. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Rev. MVZ Córdoba* 12: 1061-1067.
57. Marina S., Marina F., Torres P.J., Fosas N., Martín P., Alcolea R., Pérez N., Fernández S., Arrendó N., Jové I., Hochman M., Suñol J. 2002. Congelación de ovocitos para reproducción asistida: Revisión. *Rev. Iberoam. Fértil.* 19: 59-68.

58. Martínez Y. 2013. Análisis de la morfología ovocitaria en bovinos previa a fecundación *in vitro*. Tesis. Universidad de Oviedo. Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción. Talavera de la Reina, España.
59. Moreno D., Neira A., Dubreil L., Liegeois L., Destrumelle S., Michaud S., Thorin C., Briand A.L., Bencharif D., Tainturier D. 2015. *In vitro* bovine embryo production in a synthetic medium: Embryo development, cryosurvival, and establishment of pregnancy. *Theriogenology* 84: 1053-1060.
60. Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65: 55–63.
61. Mucci N., Aller J., Kaiser G., Hozbor F., Alberio R. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. Med. Vet.* 38: 97-104.
62. Nagashima, H., Himura K., Saito H., Tomii R., Ueno S., Nakayama N., Matsunari H., Kurome M. 2007. Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from *in vitro*-maturated oocytes. *Biol. Reprod.* 76: 900-905.
63. Ordoñez L.E.A., Merchant H., Medrano M., Kjelland M., Romo S. 2014. Lipid droplet analysis using *in vitro* bovine oocytes and embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 49: 306-314.
64. Pahuara L.E. Naveros M. 2014. *In vitro* production of bovine embryos (*Bos Taurus*) in two culture media. *Spermova* 4 (1): 54-57.
65. Palasz A.T., Gustafsson H., -Rodriguez-Martinez H., Gusta L., Larsson B., y Mapletoft R. 1997. Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. *Theriogenology* 47: 865-879.

66. Palma G.A. 2001. Biotecnología de la reproducción. 1ª Ed. Balcacere, Argentina.
67. Parrish J. 2014. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* 81: 67-73.
68. Peña J.M., Góngora O.A., Estrada L.J. 2007. Growth factors in the follicular development, embryonic early and implantation. Implications in the production of bovine embryos. *Rev. MVZ Córdoba*, 12, (1): 942-954.
69. Pieterse M.C., Kappen R.A., Kruip A.M., Taverne M.A.M. 1987. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762.
70. Ramírez O. y Bernal S. 2012. Vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Rev. U.D.C.A. Act. & Div. Cient.* 15 (2): 419-429.
71. Ratto M., Berland M., Wolter M., Matamoros R. 1999. Bovine embryo development produced by *in vitro* fertilization cultured with oviductal cell or conditioned medium and transfer to recipients. *Arch Med Vet.* 31(1): 89-96.
72. Ríos G.L., Mucci N.C., Kaiser G.G, Alberio R.H. 2010. Effect of container, vitrification volumen and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos. *Anim. Reprod.* 118 (1): 19-24.
73. Rodríguez V.P., Lozano D., Oviedo J.M., Ongaratto F.L., Bó G.A. 2012. Developmental rates of *in vitro* produced bovine embryos cryopreserved in ethylene glycol based solutions by slow freezing or solid Surface vitrification. *Anim. Rep.* 9 (2): 86-92.
74. Rojas C., Palomo J.M., Albarrancian J.L., Mogas T. 2004 Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules and actin microfilaments. *Cryobiology* 49: 211-220.

75. Saragusty J., Arav A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141: 1-19.
76. Segura G.T., Cortez J.V., Cayo I.S. 2015. *In vitro* maturation competence of bovine oocytes from three different follicular sizes. *Spermova* 5 (1): 106-109.
77. Shirazi A., Nazari H., Ahmadi E., Heidari B., Shams E.N. 2009. Effect of culture system on survival rate of vitrified bovine embryos produced *in vitro*. *Cryobiology* 59: 285-290.
78. Soto M.Y.G. 2014. Desarrollo embrionario bovino *in vitro* co-cultivado con células oviductuales y del cumulus oophorus. Tesis. Maestría en biología experimental. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México D.F.
79. Tarazona A., Olivera-Angel M. y Lenis Y. 2010. Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Arch Med.* 42: 125-133.
80. Urrego R., Tarazona A., Olivera M., Camargo O. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev Colomb Ciencias Pecuarias* 21: 398-405.
81. Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 357-364.
82. Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P.J., Jacobsen H., greve T., Callesen H. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53-58.
83. Vajta G., Kuwayama M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 65: 236-244.

84. Vajta G., Rienzi L., Ubaldi F.M. 2015. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Rep. Biom. Online.* 30: 325-333.
85. Velázquez D.J.A. y Mendieta M.E. 1999. Factores que regulan el desarrollo folicular I: folículos preantrales. Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Biología Molecular y Fisiología Gonadal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros99/foliculos.htm>. Consultada el día: 3-marzo-2016
86. Walter I, y Miller I. 1996. S-100 protein subunits in bovine oviduct epithelium: *In situ* distribution and changes during primary cell culture. *Histochemical J.* 28: 671-680.
87. Webb R., Garnsworthy P.C., Gong J.G., Armstrong D.G. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* 82: E63-74

12. ANEXOS

Anexo 1. Componentes del medio SOF base.

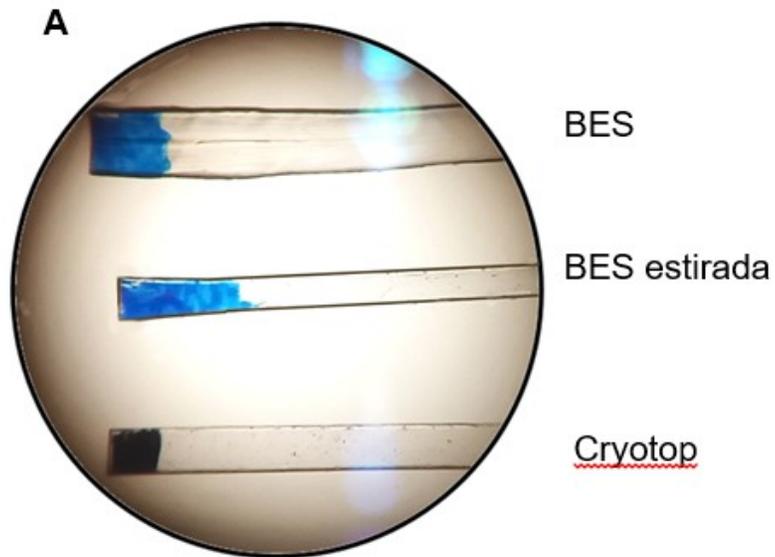
Ingrediente	Concentración
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.17 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.49 mM
KH ₂ PO ₄	1.19 mM
KCl	7.16 mM
NaCl	107.7 mM
NaHCO ₃	25.07 mM
Lactato Na	5.3 mM

1. Por cada 90 mL de solución SOF base agregar lo siguiente para preparar el SOFaa.
2. 10 mL de SOF base conteniendo 40 mg/mL de BSA libre de ácidos grasos.
3. 500 µL de Glutamax de Life Technologies no.35050-161
4. 2000 µL de piruvato de sodio, preparado inicialmente de una dilución de 0.220 g de piruvato de sodio en 100 mL de agua.
5. 1000 µL de solución de Mioinositol. Preparado inicialmente al disolver 0.998 g de mioinositol en 20 mL de agua estéril.
6. 1000 µL de solución de citrato de sodio. Preparado inicialmente al disolver 0.2941 g de citrato de sodio en 20 mL de agua estéril.
7. 1000 µL de solución de aminoácidos no esenciales (In vitro, México).
8. 2000 µL de solución de aminoácidos esenciales (In vitro, México).
9. 250 µL de solución de gentamicina. Preparado inicialmente de disolver 10 mg/mL de gentamicina.

Se agregan todos los ingredientes y se filtra, guardando el medio SOFaa en refrigeración.

ANEXO 2

Anexo 2.1 A: Comparación de los recipientes BES, BES estirada y Cryotop. B: Grosor de la BES estirada, tomando como referencia el Cryotop



ANEXO 2.2 A: BES estiradas en una caja para su fácil transporte, antes y durante su esterilización mediante rayos UV (1 hora).

