
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**EFFECTO DE LA VITRIFICACIÓN EN LA FERTILIZACIÓN Y
DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* DE OVOCITOS
INMADUROS PORCINOS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Biológicas y de la Salud

P R E S E N T A

MBRA. Miriam Fahiel Casillas Avalos

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTOR:

Dr. José Miguel Betancourt Rule
Profesor Titular C Tiempo Completo
Departamento de Ciencias de la Salud.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I

ASESORAS:

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez
Profesor Titular C Tiempo Completo
Departamento de Ciencias de la Salud.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I

Dra. Ma. Del Socorro Imelda Retana Márquez
Profesor Titular C Tiempo Completo
Departamento de Biología de la Reproducción.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I

CIUDAD DE MÉXICO

JULIO, 2018.

“El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

Miriam Fahiel Casillas Avalos el día 26 de julio de 2018.

Dr. José Miguel Betancourt Rule



Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I

PRESIDENTE

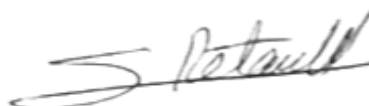
Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez



Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I

SECRETARIA

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez



Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-I

VOCAL

Dra. Ana Elena Lemus Bravo



Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-I

VOCAL

Dr. José Ernesto Hernández Pichardo



Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM-X

VOCAL

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** porque la investigación siempre me ha llevado a encontrarme con Él.

A la **UAM-Iztapalapa** por ser mi alma mater de la cual siento gran orgullo de pertenecer.

Al **CONACyT** por el otorgamiento de beca al inicio del posgrado (CVU/No. Becario: 510282/302760).

A mis **Alumnos** porque el mayor aprendizaje no se adquiere de un maestro sino de sus alumnos. Gracias a ustedes por motivarme en cada clase y por recordarme en los momentos más difíciles que no hay que rendirse nunca. Todo mi respeto y cariño, gracias por darme tanto.

Con cariño, respeto y admiración al **Dr. Miguel Betancourt** por ser desde que inicié mi carrera profesional quien me contagió el amor por la Biología. Le agradezco su digna labor y le expreso mi reconocimiento por fomentar en mí las virtudes que un investigador debe tener. Gracias por seguir sembrando en mí su conocimiento.

Con gratitud, respeto y cariño a la **Dra. Yvonne Ducolomb** por su paciencia, dedicación y profesionalismo. Por estar siempre en cada logro y enseñarme paso a paso durante tantos años que la dedicación y la constancia son la base para lograr el éxito. De usted aprendí que no existe mayor emoción que poder ver un blastocisto. Es un honor trabajar con usted. La quiero.

Con respeto a la **Dra. Socorro Retana** por sus valiosos comentarios al trabajo de tesis, por creer en mí y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en la UAM-Iztapalapa. Siempre le estaré agradecida.

Con respeto y gran admiración a la **Dra. Ana Elena Lemus** por ser una de mis inspiraciones y modelos a seguir. Gracias a usted he aprendido que un investigador debe ser alguien comprometido, alguien que solo busca el conocimiento sin esperar nada a cambio. Gracias por estar siempre para mí y por ser mi amiga. Ojalá algún día yo pueda llegar tan alto como usted ha llegado. Ha sido un honor conocerla.

Con respeto y cariño al **Dr. Ernesto Hernández** por haberme recibido en su laboratorio y por compartirme sus conocimientos para aprender la técnica de ICSI. Lo admiro como investigador y como persona. Su honestidad y sencillez lo hacen ser para mí una de las personas más valiosas que he conocido. Le agradezco por siempre tener una sonrisa para mí.

Con gratitud y cariño al **Dr. Eduardo Casas** por ser un excelente profesor y por compartir conmigo sus conocimientos. Gracias por todas sus enseñanzas.

A la **Sra. Rosalba Garduño** por sus atenciones y por siempre aceptarme en cada idea para desarrollar mi tesis. Sin usted nada de esto habría sido posible. Por el cariño que siempre me ha demostrado.

Al **MVZ. Francisco Ortíz** y a la **MVZ. Patricia López** por su participación en la transferencia embrionaria.

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

A todos los miembros de los laboratorios R-009 y R-012 por su compañerismo y respeto. En especial a la **MBRA. Alma López**, al **MBRA. Alejandro Domínguez** y a la **Dra. Lizbeth Juárez**.

DEDICATORIAS

A mi esposo

Amor, gracias por cambiarme la vida. Por guiarme profesional y personalmente. Por ser la persona que día a día me llena de motivos para vivir. Por el amor que me das y la paciencia que me tienes. Por respetarme y regalarme los mejores momentos de mi vida. Por las risas compartidas, por la felicidad que siento cuando estoy contigo, por inspirarme todos los días y por ser el amor de mi vida. Te amo y solamente tu tienes un lugar dentro de mí, que nadie más podrá tener. Le agradezco a Dios por unirnos.

*A mi **Mamá** porque cada paso siempre te lo dedico a ti. Porque en cada logro y fracaso te busco. Porque en ti encuentro esa calma y fuerza que me ayudan a seguir adelante. Porque desde el cielo le das sentido a mi vida. Te amo Ma*

*A ti **Papá** porque siempre lo has dado todo por mi. Porque tu me has enseñado que hay que luchar todos los días para salir adelante. Gracias Papá porque en cada mañana al despertar para ir a la escuela siempre me cantabas... amor chiquito acabado de nacer...*

Por ir conmigo a la escuela, por entrar a mis clases y por no dejar que el miedo me venciera. Hoy papá, gracias a ti, lo logré. Te amo Pa

*A mi **Abuelita** porque siempre me ha llenado de amor, porque me ha educado y me ha enseñado que en la vida, una carrera profesional no garantiza la educación. Esta se aprende en casa y usted ha sido un gran ejemplo a seguir. Por cada bendición antes de salir de casa y por cada momento que hemos pasado juntas. Este logro es suyo. La amo Abui*

*A mi **Nina** porque los momentos que hemos vivido juntas me han cambiado la vida. Por enseñarme que el amor no solo es decir te amo, es demostrarlo. Por dejarme estar ahí cerca de usted en los momentos de felicidad riéndonos y en los momentos difíciles siendo su compañía. Por no rendirse y por enseñarme a ser fuerte y valiente. Esto es para usted.*

A mis hermanos por todos los momentos que hemos vivido juntos. Por lo orgullosa que me siento de ustedes y por ser conmigo los mejores hermanos que la vida pudo darme. Los amo y son todo para mí.

A mis sobrinos por el amor que siempre me dan y por motivarme e impulsarme a ser mejor cada día. Porque desde que llegaron a mi vida, la cambiaron por completo. Por ser mis amados pepetes y las personitas más importantes en mi vida.

*A mi **FAMILIA** por ser el mejor ejemplo de unión, de educación y de solidaridad. Los amo.*

*A mis **Amigos** por todos los momentos que hemos compartido y por acompañarme en este viaje de vida.*

*"Nunca olvidaré el día en que me incliné al microscopio y vi algo divertido en los cultivos.
Lo que vi al inclinarme fue un blastocisto mirándome desde abajo. En ese momento pensé:*

Lo logramos".

Robert Edwards

"La ciencia sin conciencia no es más que ruina del alma".

François Rabelais

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	Páginas
1.1 Criopreservación de ovocitos inmaduros porcinos	14-20
1.1.2 Vitriificación	
1.1.3 Congelación lenta	
1.1.4 Modelo porcino	
1.2 Factores importantes para la vitriificación	21-30
1.2.1 Estado nuclear	
1.2.2 Sustancias crioprotectoras	
1.2.3 Permeabilidad y toxicidad de los crioprotectores	
1.2.4 Recipientes	
1.3 Ovogénesis en la mujer y en la cerda	30-38
1.3.1 Detención y reanudación meiótica	
1.3.2 Papel de las células de la granulosa	
1.3.3 Células del cúmulo en la maduración y fertilización	
1.3.4 Uniones comunicantes GAP	
1.4 Fecundación	38-39
1.5 Reproducción animal asistida	39-44
1.5.1 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	
1.5.2 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)	
1.5.3 Inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides (PICSI)	
1.6 Transferencia embrionaria (TE)	44-48
1.6.1 Inducción hormonal al estro	
2. ANTECEDENTES	48-51
3. JUSTIFICACIÓN	52
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	52
5. HIPÓTESIS	52
6. OBJETIVOS	53
6.1 Objetivo general	
6.2 Objetivos particulares	
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	54-56
8. MÉTODOS	57-73
8.1 Establecimiento del sistema de co-cultivo de granulosa	
8.2 Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	
8.3 Vitriificación	

8.4	Calentamiento	
8.5	Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	
8.6	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)	
8.7	Inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides (PICSI)	
8.8	Transferencia embrionaria (TE)	
8.9	Tinciones	
8.9.1	Evaluación de la viabilidad y estado acrosomal espermático	
8.9.2	Evaluación de la viabilidad de ovocitos	
8.9.3	Evaluación de la MIV y parámetros de fertilización	
8.9.4	Evaluación de las uniones comunicantes	
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
10.	RESULTADOS	73-84
11.	DISCUSIÓN	85-96
12.	CONCLUSIONES	97
13.	REFERENCIAS	98-111
14.	ANEXO	112-113
14.1	Preparación de medios de cultivo	

RESUMEN

Introducción: La mayoría de los estudios cuyo objetivo es evaluar las tasas de recuperación y desarrollo post-vitrificación de ovocitos porcinos han reportado mejores tasas cuando estos son criopreservados en estados embrionarios, pero no así en ovocitos inmaduros. Por esta razón, para mejorar los protocolos de la vitrificación de ovocitos inmaduros, se ha evaluado el uso de diferentes tipos y concentraciones de crioprotectores, recipientes, y tiempos de incubación, pero muy pocos han evaluado cual técnica de fertilización permite incrementar las tasas de producción de blastocistos en ovocitos vitrificados. El objetivo de esta tesis fue evaluar el desarrollo embrionario hasta el estado de blastocisto a partir de ovocitos inmaduros vitrificados madurados con un sistema de co-cultivo con células de la granulosa y fertilizados por fertilización *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides (PICSI). Así como, evaluar si la selección espermática con ácido hialurónico (AH) o con polivinilpirrolidona (PVP) antes de la inyección intracitoplasmática participan en forma importante en el incremento de las tasas de fertilización y producción de blastocistos.

Resultados: Los espermatozoides seleccionados con AH-PICSI mostraron un mayor porcentaje de espermatozoides vivos/reaccionados en comparación con el control y los expuestos a la PVP. Altas tasas de espermatozoides muertos/reaccionados se obtuvieron después de la exposición a la PVP en comparación con el control y el AH. En ovocitos, la viabilidad disminuyó significativamente en el control de ovocitos desnudos (DO) y en ovocitos vitrificados. Además, la maduración disminuyó significativamente en el control DO. En cuanto a los parámetros de fertilización, la FIV mostró mayores

porcentajes de monospermia en comparación con la ICSI y la PICSI. Sin embargo, los resultados demostraron que la fertilización con PICSI incrementó la formación de blastocistos en los grupos control complejo ovocito-células del cúmulo (COCs), control ovocitos desnudos co-cultivados con células de la granulosa (DO-GC) y ovocitos vitrificados en comparación con la FIV e ICSI.

Conclusión: Para lograr altas tasas de formación de blastocitos a partir de ovocitos vitrificados en etapa de vesícula germinal (VG), se recomienda que el espermatozoide se seleccione antes de ser inyectado al ovocito con AH en lugar de la PVP, debido a que se obtienen mayores tasas de viabilidad y reacción acrosomal. Además, la fertilización por PICSI es el mejor método para producir mayores tasas de blastocistos en comparación con los procedimientos de FIV e ICSI.

ABSTRACT

Background: Most studies carried out to evaluate porcine oocyte recovery and development after vitrification, have reported better rates when cryopreserved in embryonic development stages or in zygotes, but not in immature oocytes. For this reason, many studies have been performed to improve immature oocyte vitrification protocols testing the use of different cryoprotectant concentrations, cooling devices, and incubation times, but only a few of them have evaluated which fertilization procedure enhances blastocyst rates in vitrified oocytes. Therefore, this study was aimed to evaluate the embryo developmental ability and blastocyst production of porcine immature oocytes retrieved after vitrification-warming and matured with a granulose cell co-culture system, using different fertilization techniques: *in vitro* fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI), as well as to evaluate if the sperm selection with hyaluronic acid (HA) or polyvinylpyrrolidone (PVP) before injection could play a key role increasing fertilization and blastocyst formation.

Results: Sperm selected with HA-PICSI displayed a higher percentage of live/acrosome reacted status as compared to those in control (non-exposed oocytes) and exposed to PVP. Higher dead/acrosome reacted rates were obtained after PVP exposure compared to control and HA. In oocytes, viability was significantly decreased after *in vitro* maturation (IVM) in control denuded oocytes (DO) and vitrified oocytes. Besides, maturation significantly decreased in control DO. Regarding fertilization parameters, IVF showed higher percentages of monospermy than those obtained by ICSI and PICSI. However, results demonstrate that PICSI fertilization increased the blastocysts formation

rate in control cumulus-oocyte complexes (COCs), control denuded oocytes cultured with granulosa cells (DO-GC) and vitrified oocytes compared to those by IVF and ICSI.

Conclusions: To achieve high blastocyst formation rates from vitrified germinal vesicle (GV) oocytes, it is recommended that sperm should be selected with HA instead of PVP before injection since high viability and acrosome reaction rates are obtained. Also, PICSI fertilization is the best method to produce higher blastocyst rates than the IVF and ICSI procedures.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH= Ácido hialurónico
BC= Cavidad del blastocisto
BSA= Albúmina sérica bovina
CC= Células del cúmulo
COCs= Complejo ovocito-células del cúmulo
DE= Desarrollo embrionario
DO= Ovocitos desnudos
DO-GC= Ovocitos desnudos co-cultivados con células de la granulosa
DPBS= Solución buffer salina de fosfatos de Dulbecco
EG= Etilénglicol
EGF= Factor de crecimiento epidérmico
FBS= Suero fetal bovino
FITC-PNA= Isotiocianato de fluoresceína conjugado con aglutinina de maní
FIV= Fertilización *in vitro*
FSH= Hormona folículo estimulante
GAGs= Glicosaminoglicanos
ICM= Masa celular interna
ICSI= Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IP= Ioduro de propidio
IVC= Cultivo *in vitro*
LH= Hormona luteinizante
M/NRA= Muertos no reaccionados

M/RA= Muertos reaccionados
M= Mórula
Me₂SO= Dimetilsulfóxido
MI= Metafase I
MII= Metafase II
MIV= Maduración *in vitro*
MTT= bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
N= Núcleo
PBs= Cuerpos polares
pFF= Fluido folicular porcino
PICSI= Inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides
PN= Pronúcleo
PVA= Alcohol polivinílico
PVP= Polivinilpirrolidona
RVG= Rompimiento de vesícula germinal
SD= Desviación estándar
TB= Trofoblasto
TRA= Técnicas de reproducción asistida
V/NRA= Vivos no reaccionados
V/RA= Vivos reaccionados
VG= Vesícula germinal
ZP= Zona pelúcida

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Criopreservación de ovocitos inmaduros porcinos

En el área de la reproducción animal asistida, se han generado bancos de donación y mejoramiento genético animal mediante la creación de técnicas de criopreservación de gametos, lo que ha dado como resultado el mejoramiento de las técnicas de reproducción asistida (TRA), tanto en humanos como en especies domésticas (Rojas et al., 2004; Mullen et al., 2012). Las técnicas de criopreservación se han aplicado en diferentes niveles de organización desde organismos, órganos, tejidos y células (Katkov., 2012). Sin embargo, la preservación de gametos ha representado un mayor reto debido a su alta sensibilidad a las bajas temperaturas (Tabla 1) (Mazur et al., 2008).

Tabla 1. Avances de la criopreservación de gametos en diferentes especies y niveles de organización*.

<i>Especie</i>	Ovocitos	Embriones	Espermatozoides	Tejido ovárico	Tejido testicular
<i>Ratón</i>	+++	++++	+++	++	+
<i>Rata</i>	+	++++	++	++	++
<i>Cerdo</i>	+	+	++	+	+
<i>Primates</i>	+	++	++	0	++
<i>Peces</i>	0	0	+++	0	0

++++ Buena; +++ Aceptable; ++ Regular; + Pobre; 0 Nula. *Modificada de Mazur et al., 2008.

En términos de preservación, la criopreservación se clasifica en: congelación y vitrificación por inmersión en nitrógeno líquido (N₂L). A su vez, la congelación se subclasifica en: congelación lenta y congelación ultra-rápida por inmersión en N₂L. La congelación y la vitrificación son metodologías fundamentales para la criobiología, sin

embargo, su fundamento, efectividad y aplicación en los diferentes estados de desarrollo han mostrado resultados variables. Mejores porcentajes de recuperación se han obtenido cuando se criopreservan embriones en comparación con ovocitos, generando la necesidad de realizar más estudios para determinar los efectos de la vitrificación en estado inmaduro (Casillas et al., 2015b).

1.1.2 Vitrificación

La vitrificación consiste en la rápida inmersión de ovocitos o embriones en N₂L, previa exposición a altas concentraciones de crioprotectores. De esta manera, el tiempo de vitrificación es de segundos, mientras que durante la congelación lenta el procedimiento puede durar hasta 2 h. Las altas tasas de enfriamiento durante la vitrificación son de 20,000 °C/min, impidiendo la formación de cristales de hielo y por lo tanto daños morfológicos en las células (Rojas et al., 2004).

El proceso de vitrificación consiste en transformar a la célula a un estado sólido vítreo, evitando la formación de cristales de hielo. Esta técnica se ha utilizado como una alternativa al uso de la congelación lenta y, a diferencia de ésta última, requiere del uso de altas concentraciones de crioprotectores y de altas tasas de enfriamiento-calentamiento para convertir el agua intracelular en un estado vítreo. Los incrementos de las tasas de enfriamiento están directamente relacionados con el proceso de deshidratación celular antes de la vitrificación (efecto realizado por los crioprotectores), además de la selección del recipiente con bajos volúmenes (<0.1 µL). Durante la criopreservación de ovocitos o embriones se parte de una célula cuyo mayor componente

es el agua, por lo que se podría considerar que se tiene un estado líquido inicial. Este estado requiere una pseudotransición al estado vítreo, es decir, llegar a un punto intermedio entre un estado líquido y un estado sólido. A este fenómeno se le conoce como transición vítrea (Katkov., 2012). Para lograrlo se requiere de sustancias capaces de disminuir el punto de congelación para evitar el proceso de cristalización y solidificación. El punto de congelación se alcanza cuando hay una disminución de la energía cinética a medida que la temperatura disminuye. Por ejemplo, la temperatura de congelación del agua pura es a 0 °C; sin embargo, si a ésta se le añaden sales, el punto de congelación disminuye a los -2 °C. Durante el proceso de vitrificación, se añaden a las células sustancias con función anticongelante, las cuales incrementan su punto de congelación impidiendo que se formen cristales de hielo.

Desde la década de los 80's, la vitrificación ha demostrado ser superior a la congelación lenta en ovocitos de diferentes especies: humanos (Imesch et al., 2013), bovinos (Zhou et al., 2010), ovinos (Fernández-Reyes et al., 2012), porcinos (Garrieta et al., 2013; Casillas et al., 2014), y equinos (Canesin et al., 2018). Aún cuando se han reportado buenos avances con el empleo de la vitrificación, se siguen realizando diversos estudios para mejorar las condiciones del procedimiento, tomando en cuenta las características de cada especie. Por ejemplo, en el modelo porcino se ha observado un mayor porcentaje lipídico intracelular, lo cual disminuye la permeabilidad de los crioprotectores a través de la membrana plasmática, afectando a las células post-vitrificación en comparación con otras especies de importancia económica.

Desde el año de 1962, todos los trabajos reportados con el uso de la vitrificación en gametos fueron insatisfactorios debido a los altos porcentajes de daño causados por el proceso de calentamiento dañando principalmente la función mitocondrial en ovocitos (Katkov., 2012). No fue sino hasta 1985 que se obtuvo el primer éxito de la vitrificación en embriones de ratón en estado de 8 células, los cuales conservaron su viabilidad y capacidad de desarrollo después del calentamiento (Rall y Fahy., 1985). Posteriormente, en 1999 se logró el primer nacimiento de un ser humano a partir de ovocitos maduros vitrificados (Kuleshova et al., 1999).

Algunas de las ventajas de la vitrificación son: 1) disminución de la formación de cristales de hielo, 2) rapidez en el procedimiento de vitrificación y calentamiento (eliminación de la concentración de crioprotectores, incremento de temperatura y rehidratación celular), 3) tasas de enfriamiento desde los 15,000 hasta 30,000 °C/min, 4) disminución del daño osmótico por la reducción de altas concentraciones de sales, 5) reducción del tiempo del proceso total de criopreservación de 2 h a 10 min, y 6) no requiere de equipos programables altamente costosos (Liebermann et al., 2002). Las principales desventajas son: 1) el uso de altas concentraciones de crioprotectores, los cuales pueden ser altamente tóxicos (Somfai et al., 2012) y 2) el contacto directo o almacenamiento con N₂L, ya que se ha reportado que es posible que exista contaminación por bacterias y virus, los cuales pueden sobrevivir a la temperatura de -196 °C. Por ello, se han propuesto dos métodos de esterilización: el uso de filtros de cerámica (Cobo et al., 2011) y la exposición del N₂L a luz ultravioleta (Parmegiani et al., 2010). A pesar de las desventajas que esta técnica presenta, en la actualidad su

aplicación y eficiencia han mostrado ser superiores a la congelación lenta en la criopreservación de ovocitos inmaduros (Casillas et al., 2014; Casillas et al., 2015), cigotos, embriones en divisiones tempranas y blastocistos (Al-Azawi et al., 2013).

1.1.3 Congelación lenta

La primera técnica de criopreservación desarrollada fue la congelación lenta hace aproximadamente 45 años. Un estudio realizado en ratón demostró que es posible recuperar ovocitos después del proceso de congelación (Whittingham., 1971). Esta técnica consiste en la exposición de los gametos a bajas concentraciones de crioprotectores y al descenso gradual de la temperatura. La congelación lenta es también conocida como congelación de equilibrio, debido a que el intercambio de fluidos entre los espacios intra y extracelulares se llevan a cabo de forma gradual y equilibrada (Valojerdi et al., 2009). Inicialmente las células son expuestas a temperaturas de -5 a -7 °C durante varios minutos, esto se conoce como fase de equilibrio. Posteriormente se da inicio al congelamiento extracelular entre los -30 a -65 °C y finalmente el material biológico es almacenado en N₂L a -196 °C (Saragusty y Arav., 2011). Durante la congelación lenta, las bajas tasas de enfriamiento (3 °C/min) podrían afectar la viabilidad mientras que el ovocito permanece metabólicamente activo (Jain et al., 2006).

La congelación lenta se ha aplicado principalmente en la criopreservación de ovocitos maduros, reportándose el primer nacimiento humano en el año de 1986 (Chen., 1986). Una de las ventajas más importantes de esta técnica es el uso de bajas concentraciones de crioprotectores, disminuyéndose el daño osmótico y tóxico en las células. Sin embargo,

esto no ha sido suficiente para disminuir la formación de cristales de hielo intracelular, debido a que durante el descenso gradual de la temperatura que inicia desde los 37 °C o 38.5 °C (dependiendo de la especie) hasta llegar a los -196 °C y finalmente regresar a la temperatura inicial después de la descongelación, se produce una pérdida en la viabilidad celular de hasta un 40% en espermatozoides y mayor al 65% en ovocitos. En comparación con la vitrificación, la viabilidad de los ovocitos se ve mayormente afectada cuando éstos solo son congelados. Otras desventajas de esta técnica son la duración del procedimiento, que es de varias horas, y de que se requiere de equipo programable altamente costoso para congelación. Debido a lo anterior, la mayor parte de los estudios se han enfocado a incrementar la eficiencia de este procedimiento y a buscar alternativas de criopreservación, como el uso de la vitrificación, siendo esta última técnica la que actualmente ha presentado los mejores resultados en la criopreservación de ovocitos y embriones (Al-Hasani et al., 2007; Balaban et al., 2008).

1.1.4 Modelo porcino

La especie porcina desde su domesticación hace 7000-9000 años, ha sido históricamente importante como una fuente de alimento para el humano. A su vez, en la década de los 50's se inició como un posible modelo de estudio en investigación biomédica. Algunos de los acontecimientos más importantes son el aislamiento de células madre embrionarias en los 90's, la clonación de cerdos en el 2000, así como el proyecto del genoma porcino en el 2012 (Gutierrez et al., 2015). Lo anterior se ha logrado con el conocimiento de que el cerdo posee características anatómicas y fisiológicas similares al humano (Kobayashi et al., 2012). Por ejemplo, los sistemas digestivo, inmune y reproductivo son muy similares y han

permitido la realización de estudios a nivel cardiovascular, del sistema inmune, metabólico, toxicológico y reproductivo (Swindle et al., 2012), cuyos hallazgos han tenido aplicación en humanos. Por ejemplo, el tratamiento clínico de la infección causada por *Chlamydia* y el uso clínico de la insulina extraída de páncreas porcino.

El cerdo doméstico, por su tamaño (150-350 Kg), en comparación con especiales animales como la rata, el ratón y el conejo, entre otras, es un modelo de difícil manejo para ser utilizado en investigación. Sin embargo, el uso de razas pequeñas conocidas como "mini" o "micro pigs", han sido un importante avance en la investigación de xenotransplantes. Es importante resaltar que una de las razas más utilizadas para fines de investigación en Estados Unidos de América es la Yucatán, también conocida como el cerdo pelón mexicano. Esta raza tiene la característica de tener un peso de 70 Kg, facilitando su uso en laboratorio (Gutiérrez-Ruíz et al., 2012). Los principales estudios que se han realizado usando el cerdo Yucatán han tenido un enfoque como modelo cardiovascular y metabólico.

Como se mencionó anteriormente, el cerdo presenta similitudes anatómo-fisiológicas con el humano en diversos aspectos, uno de ellos el reproductivo, el cuál es el de mayor interés en este trabajo. Sin embargo, a nivel del ovocito, existen diferencias entre las dos especies. La más importante en términos de vitrificación consiste en que los ovocitos de las cerdas poseen un mayor contenido lipídico intracelular en comparación con los de la mujer, lo cual afecta la permeabilidad de la membrana a los crioprotectores. Por lo anterior, se eligió al modelo porcino para el estudio de los efectos de la vitrificación de ovocitos ya que ha sido importante en el desarrollo de las TRA en humanos, así como en mejora genética y producción animal.

1.2 Factores importantes para la vitrificación

En el procedimiento de vitrificación, los factores más importantes a considerar son: el uso de sustancias crioprotectoras, el estado nuclear de la célula, los tiempos de exposición a crioprotectores e incubación y los recipientes para su almacenamiento. Aunque se han logrado avances en la creación de técnicas de vitrificación especie-específicas, los resultados no han sido los esperados. Se han reportado bajas tasas de viabilidad, maduración, fertilización y desarrollo embrionario (DE) (5-15%) en diferentes especies como porcinos (Rojas et al., 2004; Somfai et al., 2010; Fasano et al., 2012) y ovinos (Fernández-Reyes., 2012). Sin embargo, ya se han reportado nacimientos a partir de ovocitos vitrificados en otros estados de maduración, principalmente en metafase II y en embriones en estado de blastocisto en especies como los bovinos (Vieira et al., 2002), murinos (Aono et al., 2005), y humanos (Kim y Hong, 2011). Hasta el momento, sólo un trabajo ha reportado el nacimiento de crías vivas a partir de ovocitos inmaduros vitrificados en vesícula germinal (VG) en la especie porcina (Somfai et al., 2014).

1.2.1 Estado nuclear

Para la vitrificación, el estado nuclear del ovocito es el factor de éxito más importante. La vitrificación de ovocitos inmaduros, maduros y embriones se ha realizado en diferentes especies y se ha reportado que los ovocitos inmaduros son más sensibles a las bajas temperaturas que los maduros o embriones (Somfai et al., 2012). Esto se debe a los cambios estructurales que sufre la membrana de los ovocitos en estado de VG durante la maduración. Además, se ha reportado que los ovocitos inmaduros porcinos

son más difíciles de ser criopreservados en comparación con los de otras especies debido a su alto contenido lipídico y disminuida permeabilidad (McEvoy et al., 2000). Los ovocitos al tener un alto contenido lipídico impiden que los crioprotectores puedan difundirse por todo el citoplasma protegiendo a todos los organelos. En ocasiones, los crioprotectores únicamente logran ocupar un 30% del citoplasma sin alcanzar su papel de protección, causando que al momento de vitrificar a las células se formen cristales de hielo y se comprometa su viabilidad.

Otro aspecto importante es que la vitrificación de ovocitos en etapa de VG en todos los protocolos se realiza conservando las células del cúmulo, debido a que estas células son indispensables para los procesos de arresto y reanudación meiótica. Sin embargo, en la especie porcina, las células del cúmulo y el contenido lipídico del ovocito disminuyen la permeabilidad de los crioprotectores durante los procesos de vitrificación-calentamiento, dando como resultado bajas tasas de viabilidad y maduración (Agca et al., 1998). Debido a lo anterior, se han implementado técnicas para reducir el contenido de lípidos en el porcino por des-lipidación mecánica, polarización de las gotas lipídicas citoplásmicas por centrifugación y la eliminación parcial de los lípidos por micromanipulación (Fernández-Reyes et al., 2012; Hochi et al., 2001; Vajta., 2000) incrementando las tasas de recuperación de los ovocitos. Esto sugiere que las bajas tasas de viabilidad pueden deberse a una insuficiente permeabilidad de los crioprotectores. Aunque hay estudios que indican que la presencia de las células del cúmulo es esencial para proteger a los ovocitos contra el daño inducido por el procedimiento de vitrificación en comparación con la vitrificación de ovocitos desnudos (sin células del cúmulo), la vitrificación de

complejos ovocitos-células del cúmulo (COCs) reduce la viabilidad de las células del cúmulo conservando sólo en algunos casos la viabilidad del ovocito (Casillas et al., 2015). Esto es importante debido a que las células del cúmulo establecen uniones comunicantes con el ovocito para el intercambio de moléculas como: AMPc, iones, piruvato, entre otros, requeridos para la adquisición de su función mitocondrial, maduración y capacidad fecundante. Por ello, mantener la viabilidad de las células del cúmulo, es un factor clave para la maduración de ovocitos vitrificados en estado de VG. El uso de un sistema de co-cultivo ha permitido preservar la integridad de las células del cúmulo y ha permitido incrementar la maduración, la fertilización y el DE en ovocitos denudados vitrificados en etapa de VG (Casillas et al., 2014).

1.2.2 Sustancias crioprotectoras

Una de las principales consideraciones para efectuar un proceso de criopreservación exitoso es la selección adecuada de sustancias crioprotectoras. Su principal función consiste en proteger a las células del daño que puede ser generado durante la congelación lenta o la vitrificación, ya que durante el proceso de la criopreservación, los crioprotectores están en contacto con las células para el intercambio intra y extracelular del agua, provocando su deshidratación.

Las sustancias crioprotectoras, de acuerdo a su permeabilidad celular, se clasifican en: permeables o intracelulares e impermeables o extracelulares. Los crioprotectores intracelulares tienen un bajo peso molecular y alta miscibilidad en agua, lo que les permite una alta capacidad de difusión a través de la membrana plasmática. Las

principales sustancias que ejercen este efecto son el dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG), propanediol y glicerol. Su mecanismo de acción consiste en disminuir el punto de congelación e interactuar con la membrana plasmática para prevenir una alta concentración de electrolitos. Además, los crioprotectores intracelulares pueden formar puentes de hidrógeno con el agua intracelular, impidiendo la formación de cristales de hielo.

Los crioprotectores extracelulares son sustancias de alto peso molecular que comúnmente son utilizados junto con los intracelulares para ejercer los efectos de deshidratación durante la vitrificación y re-hidratación celular en el calentamiento. Otra de sus funciones consiste en incrementar la osmolaridad en el espacio extracelular, para reducir la formación de cristales de hielo. También se ha reportado que impiden el choque osmótico durante el calentamiento. El choque osmótico es un fenómeno que ocurre cuando la presión osmótica del compartimiento intracelular es mayor que la del espacio extracelular, la cual ocurre como resultado de la deshidratación (Figura 1) (Mazur., 2004). Las sustancias utilizadas para ejercer este efecto son azúcares, tanto disacáridos como la sacarosa y trehalosa como monosacáridos como la glucosa. Sin embargo, otras sustancias como la polivinilpirrolidona (PVP) se han utilizado en los procedimientos de vitrificación

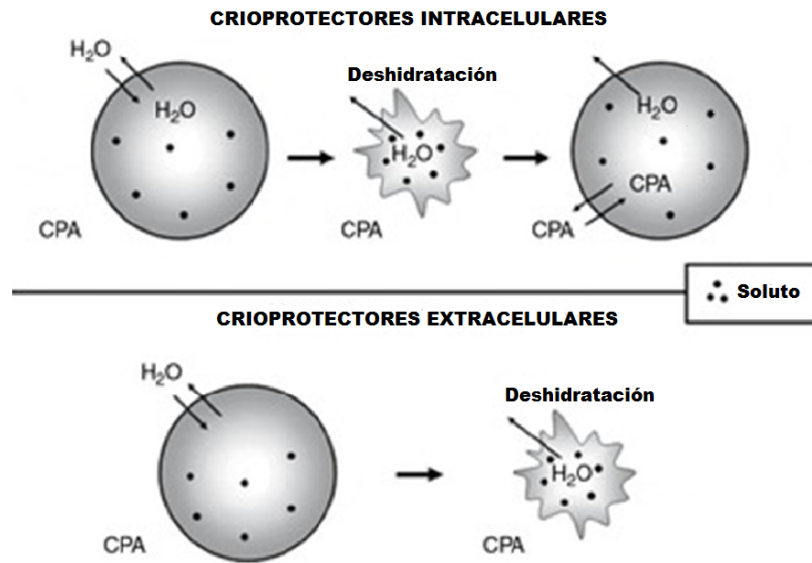


Figura 1. Papel de los crioprotectores intracelulares y extracelulares durante la vitrificación.

Los crioprotectores intracelulares permiten la salida de moléculas de agua intracelular, lo que permite la deshidratación celular e incorporación de los crioprotectores dentro de la célula. Los crioprotectores extracelulares ejercen presión osmótica en el espacio extracelular, lo que permite que nuevamente la célula se deshidrate, sacando a los crioprotectores y reincorporando las moléculas de agua para regresar al estado inicial. CPA= agentes crioprotectores.

A diferencia de la congelación lenta, durante la vitrificación se requieren altas concentraciones de crioprotectores (Fahy et al., 1984). Esto ha sido estudiado y se han reportado diferentes maneras de reducir la concentración de los crioprotectores. Una de las principales estrategias es el uso de la combinación de crioprotectores. La mezcla de DMSO y EG parece ser la más utilizada en los protocolos de vitrificación, debido a que se han reportado altas tasas de viabilidad debido a la disminución de su toxicidad e incremento en la permeabilidad (Fahy et al., 2004; Casillas et al., 2014). También se ha reportado que, en bovinos, durante la criopreservación de ovocitos inmaduros, con el empleo únicamente de EG, las tasas de maduración son de 28%, mientras que con el uso

de la mezcla de EG y DMSO se obtienen tasas de 41% (Figura 2) (Mahmoud et al., 2010).

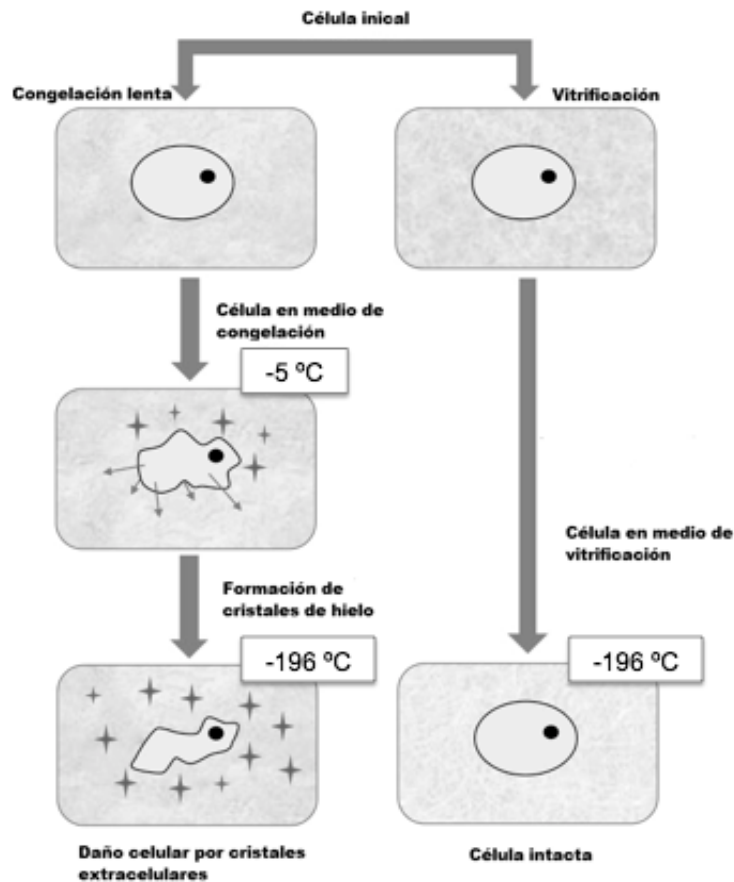


Figura 2. Procesos de vitrificación y congelación lenta en la formación de cristales de hielo.

1.2.3 Permeabilidad y toxicidad de los crioprotectores

Un factor determinante en el éxito de la criopreservación depende de los diferentes estados de desarrollo de los ovocitos; inmaduros, maduros y en estado embrionario, ya que la permeabilidad a los crioprotectores es menor en los ovocitos. Esto se ha relacionado con el volumen celular y el contenido lipídico. Se ha reportado que en los ovocitos inmaduros hay un menor espacio intracelular para la difusión de los crioprotectores debido a su alto contenido lipídico citoplasmático, especialmente en las

especies porcina y bovina (McEvoy et al., 2000). A su vez, el espacio intracelular es mayor en los estados embrionarios avanzados permitiendo mayores tasas de viabilidad en comparación con estados tempranos de división y ovocitos. Además de las diferencias entre los estados de desarrollo, también existen diferencias entre especies que determinan la resistencia a la criopreservación en los diversos estados (Tabla 2).

Tabla 2. Resistencia a la criopreservación entre especies, estados meióticos de ovocitos y de desarrollo embrionario (Casillas et al., 2015b).

Especie	Estado de desarrollo altamente resistente	Estado de desarrollo menos resistente
Humano	Blastocisto	Ovocitos inmaduros y maduros
Bovino	Mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido	Ovocitos inmaduros
Ovino	Mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido	Ovocitos inmaduros
Porcino	Cigoto y blastocisto	Ovocitos inmaduros, maduros, mórulas y blastocistos eclosionados
Equino	Blastocisto	Ovocitos inmaduros

Debido a lo antes mencionado, las tasas de viabilidad variarán en los diferentes estados de desarrollo. En los ovocitos inmaduros, maduros y probablemente en los embriones de 2 a 4 células, el agua y los crioprotectores podrían atravesar lentamente la membrana plasmática por difusión simple, mientras que, en mórulas y blastocistos, el agua, glicerol, EG y DMSO son transportados rápidamente por difusión facilitada a través de la bicapa lipídica. Por lo tanto, la vía de difusión de los crioprotectores juega un papel importante en el éxito de la criopreservación en los diferentes estados de desarrollo (Casillas et al., 2015b).

Los crioprotectores pueden incrementar su toxicidad a medida que su concentración incrementa. La toxicidad celular se refiere a la habilidad que presentan ciertos químicos para destruir células vivas. El uso de un compuesto citotóxico induce que las células se sometan a dos tipos de muerte: apoptosis o necrosis. En el organismo íntegro, el EG se metaboliza principalmente en el hígado produciendo ácido glicólico, lo cual provoca un estado metabólico de acidosis. Este ácido puede ser metabolizado a ácido oxálico, el cuál precipita con el calcio formando cristales de oxalato de calcio en muchos tejidos, principalmente en el riñón. También se conoce que el EG puede provocar irritación gastrointestinal y edema pulmonar. Sin embargo, a nivel celular la toxicidad está relacionada con la membrana celular (Best, 2015).

La toxicidad en la membrana celular es un tipo de daño, frecuentemente asociado con el DMSO. La membrana celular consta de una bicapa de lípidos con grupos hidrofílicos con cabezas polares en las superficies exteriores e interiores y con cadenas de ácidos grasos hidrofóbicos en medio de la membrana. El DMSO puede atravesar la membrana por difusión simple y puede alojarse alrededor de las cabezas polares de los lípidos que forman las membranas (Figura 3) (Gurtovenko y Anwar., 2007). También, puede difundirse y provocar liberación de calcio del retículo endoplásmico, así como llegar directamente a núcleo y promover daño al ADN (Best, 2015). Se ha reportado que el DMSO en ovocitos y embriones produce daño mitocondrial, estrés oxidante y apoptosis en células expuestas a altas concentraciones >15% (Min-Hee et al., 2017). Sin embargo, los mecanismos de acción del EG y el DMSO aún no son ampliamente conocidos.

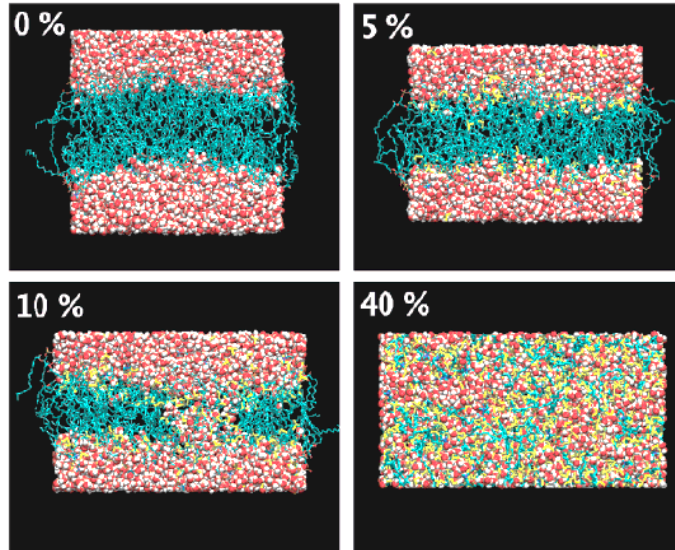


Figura 3. Efecto del uso de diferentes concentraciones de DMSO en la membrana plasmática. Los lípidos se muestran en color verde, el agua en rojo y el DMSO en amarillo (Tomada de Gurtovenko y Anwar., 2007).

1.2.4 Recipientes

Se han diseñado diferentes tipos de recipientes para permitir que los ovocitos o embriones estén expuestos a menores concentraciones de crioprotectores y alcancen una mayor tasa de enfriamiento seguida de su rápida inmersión en N_2L . Algunos de los recipientes utilizados en congelación lenta son pajillas Cryostraws (0.5-1 mL) (Lassalle et al., 1985), sistema de pajillas abiertas (SOPS) (0.25 mL) y pajillas abiertas (OPS) (0.5 mL) (Vajta., 2000) y para vitrificación, Cryoloop ($<1 \mu L$) (Lane et al., 1999), pajillas SOPS (0.25 mL) (Vajta., 2000), Cryotip (25 μL) (Kuwayama et al., 2005), Cryotop ($<0.1 \mu L$) (Kuwayama., 2007), pajilla biselada BES (0.25 mL) (Fernández-Reyes et al., 2012), superficie sólida ($<1 \mu L$) (Somfai et al., 2014) y Cryolock ($<0.1 \mu L$) (Figura 4) (Casillas et al., 2014). Además de una adecuada selección de crioprotectores, el recipiente es un factor esencial durante la criopreservación. Sistemas abiertos y cerrados han generado controversias importantes. En la criopreservación de embriones de

humano, un requisito es el uso de sistemas cerrados debido a que se debe eliminar el contacto con N_2L por la posibilidad de contaminación. Sin embargo, al comparar la eficiencia de los recipientes abiertos contra los cerrados, se han reportado nacimientos utilizando recipientes abiertos en humanos (Antinori et al., 2007), así como en especies domésticas (Somfai et al., 2014).

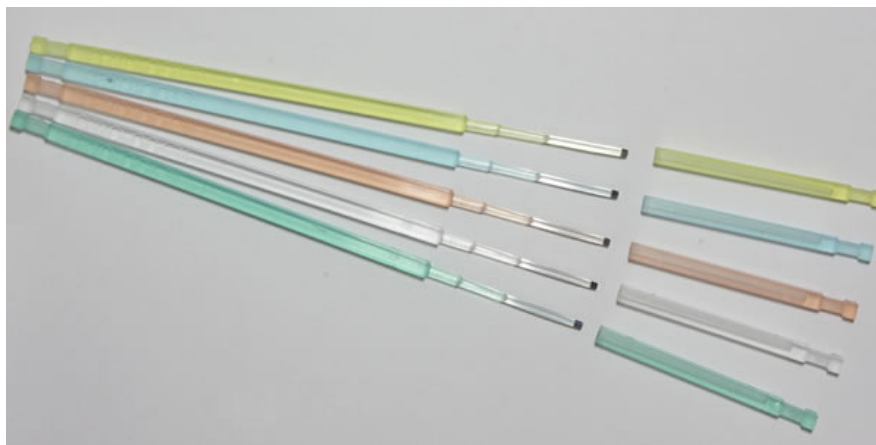


Figura 4. Recipiente Cryolock utilizado para la criopreservación de ovocitos inmaduros en este trabajo.

1.3 Ovogénesis en la mujer y en la cerda

La ovogénesis tiene lugar en el ovario y consiste en la diferenciación y maduración del ovocito. En la mayoría de los animales domésticos el desarrollo de las ovogonias y ovocitos se lleva a cabo durante la primera mitad de la gestación. En la cerda, la ovogénesis se extiende hasta las primeras semanas después del nacimiento (24 a 25 días después del nacimiento). Además, la transformación de ovogonias a ovocitos es más larga en cerdas que en otras especies (Black y Erickson., 1968). La transformación de una ovogonia puede ocurrir completamente hasta aproximadamente 30 días posteriores al nacimiento. En los mamíferos, la ovogénesis inicia aproximadamente tres semanas

después de la fertilización; las células germinales primordiales (CGP) migran a través de movimientos ameboides desde el intestino hasta la cresta genital, aún indiferenciada dividiéndose en esta área mitóticamente. Estas células continúan proliferando para mantener el “pool” de CGP mientras que otras se diferencian en ovogonias alcanzando en la octava semana de gestación alrededor de 600 mil ovogonias en la mujer. Entre las semanas 16-18 de gestación se da inicio a la formación folicular y las ovogonias son rodeadas por células somáticas epiteliales dando origen al folículo primordial. En este momento la ovogonia cesa su actividad mitótica y entra en la meiosis. Una vez iniciado este proceso de división celular, las ovogonias dan origen al ovocito primario, el cual permanece arrestado en la profase I de la meiosis I. Durante el quinto mes de gestación en el humano, el ovario fetal posee el máximo número de ovocitos (8 millones aproximadamente). Sin embargo, al nacimiento este número disminuye significativamente a un millón, quedando menos de 500 mil en la pubertad (Tabla 3) (Palma et al., 2012), de los cuales, aproximadamente 500 crecerán y madurarán hasta formar ovocitos para su fertilización.

Tabla 3. Proceso de desarrollo y factores de regulación durante la ovogénesis y foliculogénesis en mamíferos.

ESTADO DE DESARROLLO	FACTORES DE REGULACIÓN
OVOGONIA - Proliferación por mitosis	
OVOCITO PRIMARIO EN PROFASE I - Preleptoteno - Leptoteno: Inicio del apareamiento de los cromosomas homólogos - Zigoteno: Sinapsis - Paquíteno: Entrecruzamiento cromosómico Recombinación Reparación del ADN - Diploteno: Arresto meiótico	AMPc
FOLÍCULO PRIMARIO - Capa de células de la granulosa cuboidales	Activinas y AMH
FOLÍCULO SECUNDARIO - Foliculogénesis - Proliferación de células de la granulosa - Formación de células de la teca	Activinas, Inhibinas y AMH GDF-9, BMP-15
FOLÍCULO ANTRAL O DE GRAAF - Formación del antro - Formación de folículos pre-ovulatorios y cuerpos lúteos	Inhibinas, AMH, AMPc Receptores de FSH y LH
EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO	Señalización de LH, PGE2
REANUDACIÓN MEIÓTICA	MPF
OVULACIÓN	LH (Mujer) E ₂ (Cerde)
MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN DEL OVOCITO	Ca ²⁺

AMH= Hormona anti-mülleriana; GDF= Factor de crecimiento y diferenciación; BMP-15= Proteína morfogenética de hueso; PGE 2= Prostaglandina E; MPF= Factor promotor meiótico.

1.3.1 Detención y reanudación meiótica

Durante la gestación, los ovocitos quedan detenidos en etapa de VG (inmaduros) debido a las células foliculares, específicamente las del cúmulo, que son las responsables del mecanismo de detención meiótica a través de la producción y liberación de moléculas como el AMPc. Las señales de inhibición de las células foliculares pueden transmitirse al ovocito por las uniones comunicantes (Betancourt et al., 2003). Durante el arresto meiótico, las células foliculares proveen un ambiente con altos niveles de AMPc y sólo cuando los niveles de AMPc disminuyen, las uniones comunicantes se cierran, inactivándose la protein-kinasa dependiente de AMPc (PKA) que a su vez activa la desfosforilación del factor promotor de la maduración, el cual promueve la reanudación meiótica (Figura 5). En la pubertad incrementan los niveles de la hormona LH producida por la activación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, lo cual promueve en las células foliculares la reanudación de la meiosis. La disminución de los niveles de AMPc en el ovocito se lleva a cabo por la fosforilación de la conexina 43 y la activación de la fosfodiesterasa 3 A (PDE3A) (Zhang et al., 2009).

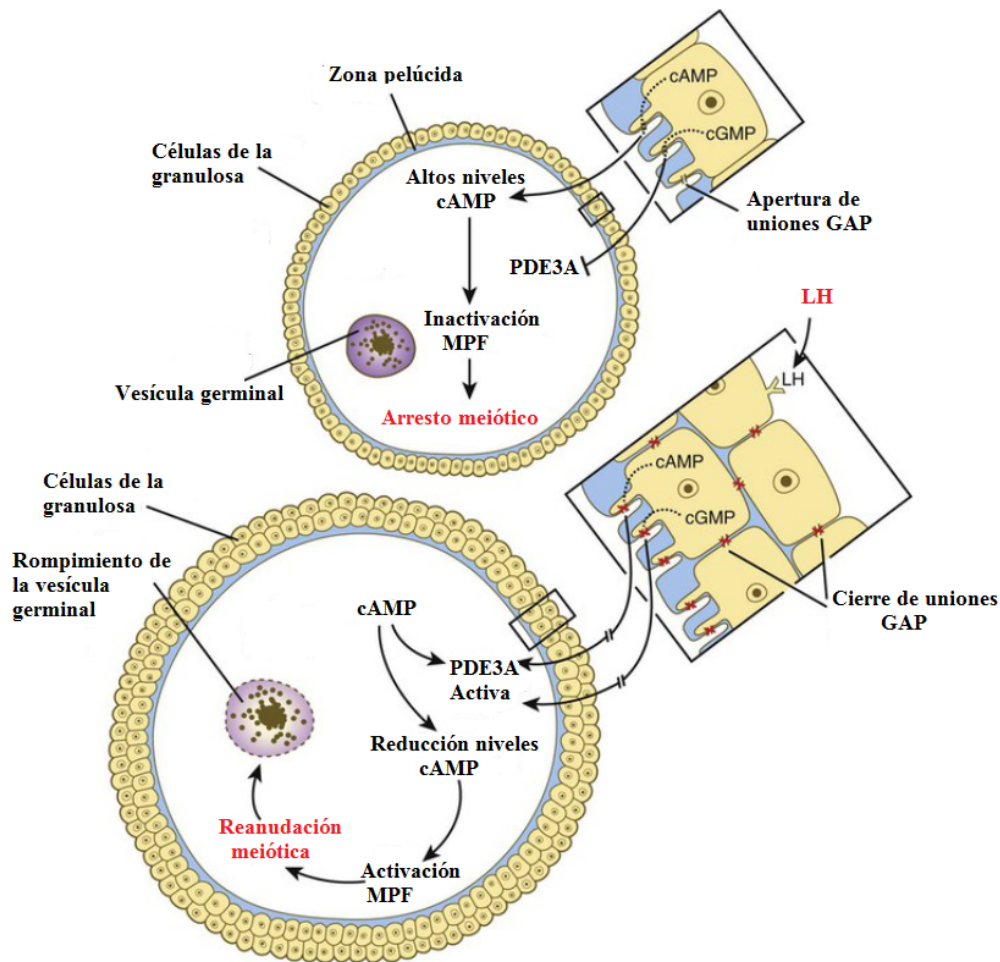


Figura 5. Arresto y reanudación meiótica en el ovocito de mamífero.

1.3.2 Papel de las células de la granulosa

Durante la foliculogénesis ocurre la diferenciación y actividad de las células foliculares de las cuales existen dos tipos: las células de la teca y las de la granulosa.

Las células de la teca tienen una función esteroidogénica específica, estimulada por la hormona LH. Estas células son capaces de sintetizar andrógenos, principalmente testosterona y androstenediona a partir del colesterol. Además de tener actividad esteroidogénica, las células de la teca participan en la reanudación de la meiosis para la maduración del ovocito. En el folículo ovárico, además de las células de la teca, existen

las células de la granulosa, las cuales se subdividen en tres tipos: cúmulo o *corona radiata*, antrales y murales. Cada tipo de célula presenta funciones diferentes, las del cúmulo, son las más próximas al ovocito y son las encargadas de mantener el arresto meiótico a través de las proyecciones de uniones GAP con el ovocito, así como de intervenir en el proceso de fertilización. Estas células presentan receptores de LH y FSH, jugando un papel importante en la pubertad para promover el mecanismo de reanudación meiótica. Las células del cúmulo no tienen función esteroideogénica, por lo que las granulosa antrales y murales son las que van a promover la aromatización de los andrógenos para sintetizar estrógenos, requeridos para la maduración del ovocito. Por otro lado, las células de la granulosa producen activinas e inhibinas encargándose de la activación o inhibición de la síntesis de FSH (Sánchez y Smitz, 2012).

1.3.3 Células del cúmulo en la maduración y fertilización

En algunas especies de mamíferos como el cerdo y el humano, las células del cúmulo son esenciales para llevar a cabo la fertilización *in vitro* (FIV), debido a que promueven la reacción acrosomal (Yanagimachi., 1994).

Las células del cúmulo secretan ácido hialurónico (AH) y permiten el reconocimiento espermatozoide-ovocito para la fertilización. Un incremento en la actividad de estas células en cuanto a la producción de grandes cantidades de AH es una señal *in vitro* de la expansión celular (mucificación) y por lo tanto maduración del ovocito. En el ovocito maduro, las células del cúmulo promueven durante el reconocimiento espermatozoide-ovocito, la activación enzimática de la hialuronidasa acrosomal espermática para degradar la barrera del cúmulo y permitir la entrada del espermatozoide al ovocito. *In*

vivo, los espermatozoides capacitados entran en contacto con las células del cúmulo y logran atravesar esta barrera gracias a la motilidad espermática y a la presencia de la proteína PH-20. El dominio N-terminal de esta molécula, tiene actividad de hialuronidasa y tiene un papel importante tanto en la penetración del cúmulo como en la unión a la zona pelúcida (ZP). Sin embargo, posteriormente se demostró que la proteína *Hyal5* con actividad hiasa es la que permite la penetración a través de la barrera del cúmulo mediante la digestión de la matriz del ácido hialurónico (Coy y Cánovas., 2008). Por ello, el papel del AH es importante durante la fertilización *in vivo* e *in vitro*.

Las hiasas en los mamíferos constituyen una familia de 6 enzimas que catalizan la ruptura del AH en el ovocito y que también están implicadas en la unión a la ZP. Anteriormente se creía que la PH-20 era la única hialuronidasa implicada en la penetración espermática a través de la barrera del cúmulo. Sin embargo, en el humano y en el ratón se han logrado identificar al menos 6 genes que codifican para las enzimas: HYAL1, HYAL2 y HYAL3 en el cromosoma 21 (humano), Hyal4, PH-20/SPAM1 y HYALP1 en el cromosoma 31 (humano). En el ratón: Hya/1, Hya/2 y Hay/3, Hya/4, ph-20, Hya y/p1 y Hya/5.

Las hiasas PH-20 y Hya/5 están ancladas a la membrana acrosomal o plasmática de los espermatozoides. La PH-20 se localiza principalmente en la membrana plasmática de los espermatozoides con acrosoma intacto, mientras que Hay/5 se localiza tanto en la membrana plasmática (60% del total) como en la membrana acrosomal (40%). Esto explica el papel de ambas hiasas tanto en la degradación del cúmulo como en la penetración de la ZP (Núñez y Caballero., 2014). Aunque se conoce que la proteína PH-

30, también llamada fertilina, es una de las principales moléculas responsables de la unión de las membranas del espermatozoide y del ovocito.

El AH, no sólo es producido por las células de la granulosa, también se encuentra en altas concentraciones en el oviducto, el cual podría tener una influencia positiva en mantener la viabilidad espermática mientras los gametos logran llegar al sitio de la fertilización (Byeong-Gyun et al., 2001).

1.3.4 Uniones GAP

El crecimiento del ovocito en los mamíferos, depende de la funcionalidad de las células foliculares que lo rodean. Las células de la granulosa proveen al ovocito nutrientes esenciales para las etapas posteriores como la maduración, la fertilización y el DE, por lo que las interacciones entre el ovocito y las células de la granulosa permiten el desarrollo y crecimiento del ovocito, así como su maduración. La interacción o comunicación del gameto con las células de la granulosa se da a través de las uniones GAP (Senbon., 2003). Estas uniones consisten en arreglos de canales intercelulares los cuales permiten el intercambio de compuestos por difusión pasiva de moléculas menores a 1 kDa como: los iones, los azúcares, los segundos mensajeros y el agua (Sohl., 2004). Las uniones GAP son hemi-canales también llamados conexones, cada uno de ellos está constituido por seis subunidades proteicas transmembranales llamadas conexinas (Santiquet., 2013).

Las uniones GAP son de gran importancia, debido a que están involucradas en los procesos de arresto y reanudación meiótica. Estas uniones permiten una comunicación directa por la que el AMPc entra al ovocito, inhibiendo la fosfodiesterasa A,

manteniendo los niveles altos del AMPc intracelular y por lo tanto el arresto meiótico. Para la reanudación, la activación del receptor de LH en las células de la granulosa, reduce el flujo de AMPc causando el cierre de las uniones GAP, promoviéndose la reanudación meiótica (Norris., 2010). Por lo anterior, cualquier daño en estas estructuras podría comprometer la maduración del ovocito, entonces, es importante poder determinar si la criopreservación ejerce algún efecto en las uniones GAP.

1.4 Fecundación

Durante la fecundación, los gametos se reconocen y fusionan sus membranas para desarrollar un nuevo individuo diploide con la información genética de ambos progenitores. El espermatozoide formado en los túbulos seminíferos del testículo sufre modificaciones durante su paso por el epidídimo (maduración) y el oviducto (capacitación). Una vez en el oviducto, en la zona ampular ístmica, los gametos se encuentran para establecer contacto. El espermatozoide se encuentra inicialmente con las células del cúmulo y las degrada enzimáticamente por acción de la enzima hialuronidasa. Posteriormente, las glicoproteínas de la ZP se unen al receptor ZP3 lo que estimula la reacción acrosomal, liberándose enzimas como la tripsina y la acrosina. Esto permite el paso del espermatozoide por esta zona y la fusión de ambos gametos, seguida de la entrada del espermatozoide al ovocito. Esta serie de eventos desencadena la reacción cortical para el bloqueo natural de la polispermia y asegurar que sólo un espermatozoide haya fecundado. Una señal importante, originada por la entrada del espermatozoide es el incremento de Ca^{2+} intracelular, lo que favorece la reacción cortical, así como la descondensación del pronúcleo masculino. De esta manera se asegura que el embrión a

desarrollarse sea diploide. A su vez, el incremento de Ca^{2+} permite la terminación de la meiosis, así, el ovocito fecundado se denomina cigoto, con ambos núcleos haploides o pronúcleos, cada uno proveniente de cada progenitor. Ambos pronúcleos migran al centro del citoplasma para que el cigoto diploide inicie la mitosis para formar al embrión. Las primeras divisiones mitóticas del embrión ocurren en el oviducto, y al llegar a la etapa de blastocisto se implanta en el útero para la formación de la placenta y continuar así con el DE y fetal. En el cerdo, el periodo de gestación es de aproximadamente 114 días.

1.5 Reproducción Animal Asistida

En general, en términos de reproducción asistida (RA) existen dos vertientes importantes a considerar. Por un lado, en el humano se ha incrementado la necesidad de resolver los problemas de infertilidad masculina y femenina. Lo anterior tuvo un gran auge en la década de los 70s con el nacimiento de Louise Brown. El Dr. Edwards desarrolló la técnica de FIV y permitió en 1978 registrar el primer nacimiento mediante esta tecnología. Desde esas fechas, se han desarrollado diversas técnicas de RA en humanos como son la ICSI, PICSI e inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI), las cuales han permitido no solo incrementar las tasas de concepción, sino que también se ha logrado realizar diagnóstico genético preimplantacional, biopsia embrionaria, hibridación *in situ*, conservación de gametos (Chen., 1986), bancos de donación, sistemas “time-lapse” para seguir el DE desde la incubadora sin la necesidad de abrirla (Brezina et al., 2012). La otra vertiente es el avance de la RA en especies de importancia económica. La ineficiencia reproductiva se

considera una de las causas más importantes de pérdida económica en la industria pecuaria mundialmente. A pesar de que se han logrado avances importantes en razas comerciales tanto bovinas como porcinas, aún se registran bajas tasas de concepción y altas tasas de mortalidad embrionaria debido a problemas principalmente genéticos de endogamia y pérdida de heterosis. Por ello, actualmente surge una gran necesidad de producir animales genéticamente mejorados para incrementar las características de prolificidad y calidad de la carne (Verma et al., 2012). Una de las principales TRA ha sido la inseminación artificial, aunque, hoy en día la aplicación de tecnologías más avanzadas como la criopreservación, la ICSI y la PICSÍ en animales domésticos representa un mayor reto. Aunque, en estudios previos se ha demostrado que la FIV es más eficiente que la ICSI en la producción de blastocistos porcinos, los porcentajes podrían incrementarse con nuevas TRA (Casillas et al., 2015).

1.5.1 Fertilización *in vitro* (FIV)

Se realizaron muchos experimentos al inicio de 1878, los cuales contribuyeron al éxito de la FIV 75 años después. El descubrimiento de la capacitación espermática en 1951 permitió el desarrollo de la FIV en diversas especies, incluyendo a los porcinos (Chang., 1952). La FIV ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos involucrados en los procesos de la fecundación y el DE, además de ser una TRA para el tratamiento de problemas de fertilidad. Esta tecnología reproductiva permite la producción de embriones, los cuales pueden ser utilizados para investigaciones de diagnóstico genético (aneuploidías), para incrementar la productividad en animales de importancia económica, así como para preservación de especies. Actualmente, diversos

protocolos de FIV han sido desarrollados y se encuentran disponibles en la literatura científica, donde se indican las características especie-específicas. Así, hasta la fecha se ha reportado el nacimiento de crías vivas en humanos (1978) así como en ovinos (1984) y en porcinos (1983) (Bavister., 2004).

Aunque se ha empleado su uso en los últimos 45 años, muchas de las clínicas de RA en humanos han considerado a la técnica de FIV como obsoleta debido al incremento de embarazos múltiples, altas tasas de polispermia y a la introducción de nuevas tecnologías que permiten seleccionar espermatozoides por sexo y realizar modificaciones genéticas (Espinoza-Cervantes y Córdova-Izquierdo, 2013).

1.5.2 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

La historia de la ICSI se remonta a 1962, cuando se reportó su uso en ovocitos de erizo de mar (Hiramoto et al., 1962). Sin embargo, fue hasta 1976 que se reportó exitosamente en mamíferos, principalmente en hámster (Uehara y Yanagimachi., 1976). El desarrollo de la ICSI constituyó un avance importante en la RA. Su aplicación está indicada cuando la FIV no logra resolver el problema de fertilidad, con el uso de espermatozoides seleccionados (sexados o genéticamente modificados), espermatozoides inmóviles o tratados (congelados, desecados), evitar la polispermia, xenotransplantes, estudios embrionarios y para la conservación de especies en peligro de extinción (García-Roselló et al., 2006).

Con la técnica de ICSI se excluyen los procesos que ocurren de manera natural en la fertilización, los cuales son necesarios para una fecundación exitosa, como la reacción

acrosomal, unión a la ZP y fusión de membranas, así como la reacción cortical. La ICSI consiste en el uso de dos micromanipuladores acoplados a un microscopio invertido, que permite la captura de un único espermatozoide (pipeta de inyección) y su inserción al citoplasma del ovocito (pipeta de sujeción).

En el porcino, ha sido importante el desarrollo de tecnologías que permitan disminuir los porcentajes de polispermia, ya que dan origen a embriones con altos porcentajes de aneuploidías (modificación en el número de cromosomas, la cual puede consistir en la ausencia o exceso de cromosomas). Con ICSI, es posible solucionar este problema, debido a que los cigotos resultantes son monospermicos. A pesar de lo anterior, no solo aplicado a esta especie, se han reportado bajas tasas de fertilización, DE, implantación, gestación y nacimientos (Fernández-Reyes et al., 2012; Casillas et al., 2014; Somfai et al., 2014; Casillas et al., 2015).

Dado que el éxito de la fertilización por ICSI no se ha alcanzado pues se reportan bajas tasas de blastocistos (<20%) se han empleado estrategias como la activación del ovocito (Hernández-Pichardo et al., 2016), uso de medios semidefinidos como el "porcine zygote medium 5" PZM5 (Cao et al., 2012), así como la adición de sueros que incrementan en un 10% las tasas de desarrollo, sin embargo, estas siguen siendo bajas. Por lo anterior, se ha propuesto que la selección espermática juega un papel importante. Durante la ICSI, los espermatozoides se colocan en un medio con PVP, cuya función principal es inmovilizarlos para facilitar su captura. Se ha reportado que esta sustancia es ampliamente tóxica, por lo que, al seleccionar al espermatozoide e inyectarlo en el

citoplasma del ovocito, la PVP puede producir daños tanto a nivel espermático como del ovocito, disminuyendo la capacidad de fertilización y desarrollo (Kato y Nagao., 2012). Por lo anterior, han sido desarrolladas mejoras en la técnica de ICSI como la selección espermática por contacto de la ZP o con el uso del ácido hialurónico (AH).

1.5.3 Inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides (PICSI)

Debido a las bajas tasas de éxito en la producción de blastocistos con ICSI (2-20%) que se han reportado en especies domésticas, ha sido necesaria la creación de nuevas estrategias que mejoren las TRA. Una de ellas es el método de PICSI, el cual se basa en la habilidad que presenta el espermatozoide para reconocer y adherirse al AH, tratando de igualar el reconocimiento natural entre un espermatozoide capacitado y las células de la granulosa del ovocito. El espermatozoide en la fertilización natural se encuentra con la primera barrera que son las células de la granulosa, las cuales sintetizan AH, permitiendo el reconocimiento de los gametos. Este evento es muy importante debido a que va a tener una directa relación en eventos posteriores como el DE e implantación. Un espermatozoide que es capaz de reconocer al AH conserva la viabilidad, así como madurez y actividad enzimática. Por lo anterior, el AH permite identificar a los espermatozoides que tienen mejor calidad y que son aptos para la fertilización (Parmegiani et al., 2010). Las cajas de Petri de PICSI son de plástico y contienen tres microgotas de AH. Cada gota debe ser rehidratada añadiendo 5 μ L de medio de cultivo para posteriormente colocar la muestra espermática. La selección espermática con AH seguido de la ICSI permite optimizar la fertilización debido a que, en términos prácticos, los espermatozoides adheridos al AH se inmovilizan y son fáciles de capturar, y el medio

de cultivo, así como el AH son sustancias naturales que no causan efectos deletéreos en el espermatozoide como la PVP.

La PICSI representa un mejor método alternativo para las TRA con un fundamento más cercano a la fecundación natural en comparación con la ICSI convencional (Parmegiani et al., 2010). En apoyo a lo anterior, la PICSI se está aplicando actualmente en humanos y se ha reportado que se obtienen mayores tasas de embarazo y nacimientos en comparación con la ICSI. Este estudio sugiere que la inyección de espermatozoides seleccionados con AH mejora el DE y la producción de blastocistos (Parmegiani et al., 2010). En virtud de que este método no se ha empleado en especies domésticas, es importante evaluar la posibilidad de obtener mejores tasas de DE y blastocistos no sólo de ovocitos frescos, sino también con ovocitos vitrificados.

1.6 Transferencia Embrionaria

La transferencia de embriones (TE) al igual que la criopreservación, es una TRA que se desarrolló desde hace aproximadamente 60 años. En especies de importancia económica, la TE permite incrementar el número de descendencia por hembra, reduciendo el intervalo entre generaciones, y proporciona garantía sanitaria, así como la creación de líneas genéticas. Por lo anterior, esta técnica ha sido ampliamente empleada en bovinos, ovinos y, en porcinos, se logró desde 1951 por Kvasnickii.

Para llevar a cabo la TE en cerdas, se han reportado importantes criterios para seleccionar a las hembras receptoras:

- 1) Antes de la selección las cerdas donantes y receptoras deberán ser sometidas a pruebas serológicas para detectar enfermedades, principalmente contagiosas.

-
- 2) Se puede administrar un tratamiento antiparasitario a cerdas donantes y receptoras para prevenir padecimientos.
 - 3) La alimentación de las cerdas debe ser esencial, debido a que las deficiencias energéticas podrían comprometer su reproducción.
 - 4) La cerda donante deberá presentar un alto valor genético.
 - 5) La cerda receptora deberá haber tenido al menos un parto en la temporada reproductiva.
 - 6) Deberán excluirse cerdas que presenten infección o fluidos vaginales que puedan ser por causa de una inflamación uterina (metritis).

1.6.1 Inducción hormonal al estro

Tratamientos hormonales para cerdas donantes y receptoras

El tratamiento hormonal permite la inducción del estro en receptoras y la superovulación en donantes, en un momento determinado. Esta estimulación hormonal imita los mecanismos endocrinos naturales que regulan el ciclo estral (Figura 6; Tabla 4) y la conducta sexual

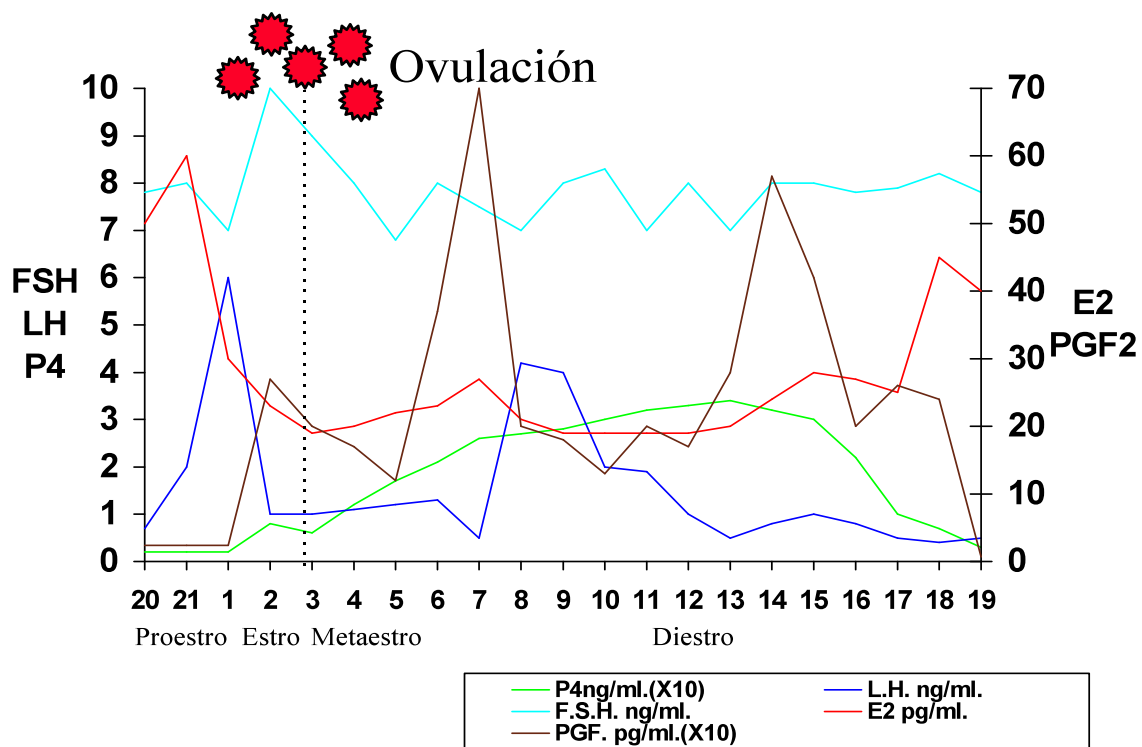


Figura 6. Ciclo estral de la cerda.

Adaptada de: Jochle, W., Lamond, R.D. Control of reproductive functions in domestic animal. VEB, German Democratic Republic. 1980. Hunter, R.H.F. Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos. Acribia, Zaragoza, España. 1990. Valencia, M.J. Fisiología de la reproducción porcina. Trillas, México, D.F. 1991. Howard, J.B. Biol. Reprod. 24 (1), 1981.

Estimulación para cerdas donantes (superovulación):

- 1) Las hormonas LH y FSH son glucoproteínas sintetizadas en la adenohipófisis cuya función es promover el crecimiento y maduración folicular. La FSH induce la formación de receptores de LH y mantiene la secreción de estrógenos, principalmente estradiol. La LH al incrementar su concentración en sangre promueve el pico pre-ovulatorio para inducir la ovulación. Sin embargo, en las cerdas se ha reportado que el pico de estrógenos promueve la ovulación. Su uso para la superovulación se lleva a cabo en la mujer, y para animales domésticos se emplean sustancias análogas consiguiendo el mismo efecto.

-
- 2) La gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) o gonadotropina coriónica equina (eCG) es una gonadotropina extraída del suero de yeguas preñadas que posee doble actividad, tanto de LH como de FSH. Su uso principal es en ovejas y cabras, aunque también se usa en cerdas para la sincronización del estro.

Existen dos tipos de estimulación aplicados a cerdas receptivas:

- 1) Estimulación con progestágenos. La progesterona es una hormona esteroide secretada por el cuerpo lúteo ovárico cuya función principal es el mantenimiento de la gestación. Su uso para la estimulación del ciclo estral permite la regresión de la fase lútea en la cerda para que al disminuir su concentración se reinicie la fase folicular.
- 2) Estimulación con la prostaglandina F2 α . Esta prostaglandina es una molécula de naturaleza lipídica, secretada principalmente por el endometrio uterino (en cerdas). Un incremento en su secreción induce la destrucción del cuerpo lúteo (luteólisis), con la consecuente disminución de la progesterona y reinicio del estro.

Tabla 4. Parámetros del ciclo reproductivo en la cerda

Cerdas	
Ciclicidad	Continua
Madurez sexual	4-6 meses (dependiendo de la raza)
Duración del ciclo estral	19-21 días
Fase folicular/Fase lútea	5-6 días/15-17 días
Inductor de la luteólisis	PGF2α Uterina
Sangrado	No

Conocer los parámetros del ciclo reproductivo de la cerda permite que la inducción hormonal al estro y la TE se logren exitosamente.

2 ANTECEDENTES

En estudios previos se ha reportado que el uso de un sistema de co-cultivo de células de la granulosa incrementa la maduración *in vitro* (MIV) del ovocito. Un trabajo de Ge et al., (2008) demostró que el uso de un co-cultivo de células del cúmulo durante la MIV incrementaba no sólo las tasas de MIV sino también las tasas de FIV en ovocitos inmaduros frescos de ratón. Por lo tanto, es importante determinar la concentración óptima de células de la granulosa para el co-cultivo, debido a su papel inhibitor a altas concentraciones. Un estudio utilizando ovocitos porcinos desnudados antes de la MIV reportó que el uso de una monocapa de células del cúmulo a una concentración de 3×10^5 células/pozo no era capaz de incrementar las tasas de MIV, pero sí la formación de blastocistos (Zhang et al., 2010).

En otro trabajo se demostró que el uso de un co-cultivo de células de la granulosa a una concentración de 1×10^6 células/pozo en los ovocitos vitrificados fue capaz de incrementar las tasas de MIV y DE. Además, se ha observado que las células en co-cultivo establecen quimiotactismo con los ovocitos, rodeándolos como si estos nunca hubieran sido desnudados (Casillas et al., 2014). Por lo anterior uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar si las uniones comunicantes se afectan por la vitrificación o si la comunicación existente con el ovocito es únicamente vía paracrina en el sistema de co-cultivo. Así como determinar si este sistema permite no sólo mejorar la MIV sino también la FIV y el DE mediante las técnicas de FIV, ICSI y PICSI.

Para la vitrificación, es importante evaluar sus efectos tanto a nivel morfológico como fisiológico. Está demostrado que la vitrificación causa alteraciones en el citoesqueleto, así como en los cromosomas de ovocitos cuando se han vitrificado en etapa de metafase II (Rojas et al., 2004). Otros estudios señalan que la vitrificación disminuye significativamente el potencial de desarrollo de los ovocitos, al disminuirse las tasas de maduración, fertilización y DE (Somfai et al., 2010; Fasano et al., 2012; Fernández-Reyes et al., 2012; Casillas et al., 2015). Además, se ha observado que los ovocitos porcinos tienen una mayor crio-sensibilidad debido al alto contenido lipídico intracelular.

Además de la vitrificación, la elección de la técnica de inseminación y la selección espermática puede afectar de manera importante los parámetros de fertilización. Es por esto que, en la actualidad, el uso de la FIV en los humanos ha ido disminuyendo, debido a que este procedimiento no excluye eventos como la polispermia, por lo que fue

necesario desarrollar nuevas TRA. Una de éstas es la PICSI, en la cual se tiene una selección espermática, a diferencia de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) simple, por lo que su uso en la actualidad puede superar a la FIV. Sin embargo, en la producción animal no se han investigado las ventajas o desventajas de ambas técnicas y pocos estudios se han realizado para determinar cuál sería la mejor técnica para la producción de crías vivas a partir de ovocitos vitrificados (Tong et al., 2012).

Los resultados obtenidos en trabajos previos demuestran que los ovocitos vitrificados fertilizados con ICSI se desarrollan a blastocisto en menor porcentaje que los fertilizados por FIV (Casillas et al., 2014; Casillas et al., 2015). Este hallazgo coincide con un trabajo reportado en especies domésticas en donde hay un mayor porcentaje de fertilización empleando la técnica de FIV en comparación con ICSI (Catt et al., 1995). Sin embargo, existen pocos trabajos donde se hayan utilizado ovocitos vitrificados; ya que la mayoría reportan el uso de estas técnicas en ovocitos frescos. En apoyo a lo anterior, con la técnica de ICSI se obtiene un mayor porcentaje de embriones degenerados y ovocitos no activados, además en ovinos el porcentaje de blastocistos por FIV es del 18.8% vs 8.5% por ICSI, indicando que la FIV es una técnica más eficiente (Catt et al., 1995).

La diferencia de los resultados entre las técnicas de FIV e ICSI se pueden explicar debido a que en el procedimiento de ICSI los espermatozoides evitan algunos de los pasos importantes que ocurren antes o durante la fecundación natural. Estos incluyen:

reacción acrosomal, penetración de la ZP, fusión con el oolema, reacción cortical y activación del ovocito. Además, algunos trabajos señalan que las bajas tasas de DE por la técnica de ICSI se deben a que se presentan fallas en la descondensación de la cromatina espermática (Li et al., 1999) o bien anomalías en los cromosomas sexuales (Hewitson et al., 2000), eyección espermática, fallas en la fertilización o en la singamia (Shirazi et al., 2009), ruptura de la membrana permitiendo el paso de la PVP, utilizada para la selección espermática (que puede ser tóxica en altas concentraciones) impidiendo principalmente la activación del ovocito (Flaherty et al., 1995).

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

En este trabajo se propuso emplear las técnicas de ICSI, PICS y FIV en ovocitos porcinos vitrificados en estado de VG con un sistema de co-cultivo para la obtención de crías vivas en la especie porcina y superar los porcentajes de MIV, FIV, DE y TE previamente reportados.

3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios de vitrificación de ovocitos, están enfocados a mejorar los protocolos a través del uso de diferentes sustancias crioprotectoras, tiempos de exposición y recipientes. Sin embargo, pocos estudios evalúan la eficiencia de las TRA en parámetros de fertilización, DE y producción de crías. Además, pocos estudios se han realizado para evaluar los efectos causados por vitrificación en aspectos morfo-fisiológicos. Hasta el momento no se ha reportado si las uniones comunicantes sufren alteraciones como una posible explicación de la disminución de las tasas de maduración de ovocitos vitrificados en VG. Además, pocos estudios han evaluado la eficiencia de las TRA en la producción de crías vivas a partir de ovocitos vitrificados. La mayor parte de los estudios reporta resultados hasta el efecto en el DE, sin embargo, es necesario conocer si la vitrificación puede tener un efecto en el nacimiento y desarrollo de las crías. Por lo anterior, se requieren más estudios que puedan evaluar los efectos causados por la vitrificación y su repercusión en aspectos morfológicos y de desarrollo.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la eficiencia de las técnicas de reproducción asistida (FIV, ICSI y PICS) en la producción de embriones a partir de ovocitos porcinos vitrificados en estado de VG?

5. HIPÓTESIS

En virtud de que la técnica de PICS) permite una selección espermática por medio del AH, entonces, los ovocitos porcinos fertilizados por PICS) se desarrollarán de manera óptima en comparación con los producidos por las técnicas de FIV e ICSI.

6. OBJETIVOS

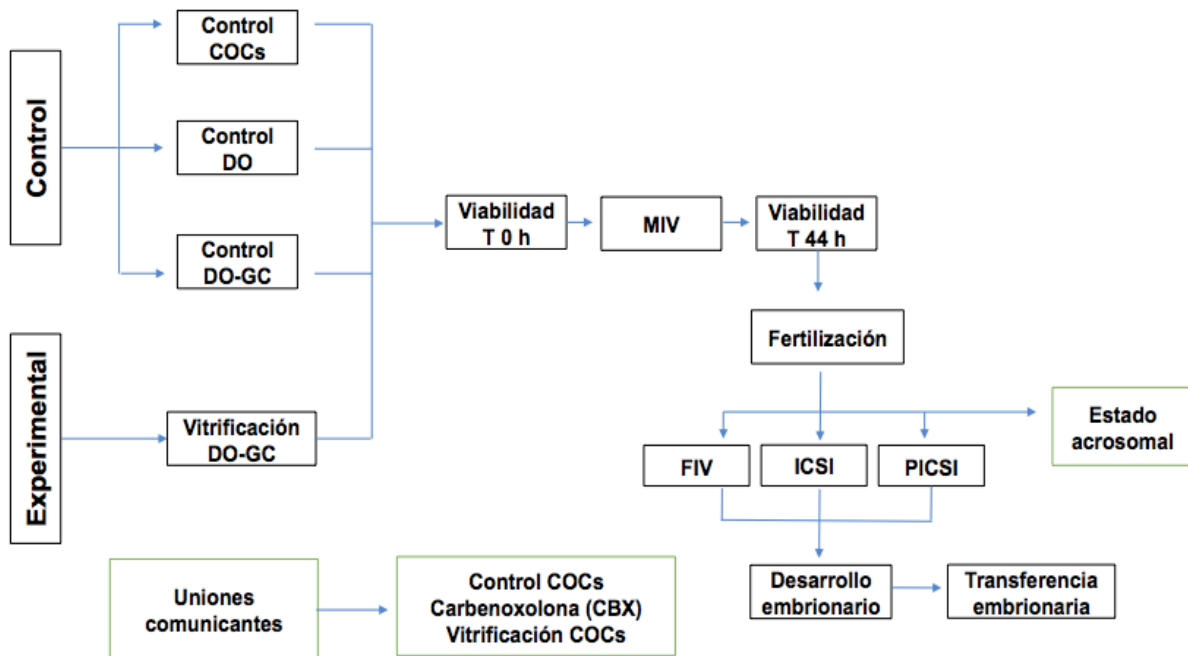
6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de la fertilización por FIV, ICSI y PICSI, así como el desarrollo embrionario a partir de los ovocitos inmaduros porcinos vitrificados.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la viabilidad de los ovocitos post-vitrificación y post-maduración.
- Evaluar la tasa de maduración *in vitro* en ovocitos vitrificados desnudos con células de la granulosa agregadas al medio de cultivo.
- Evaluar el efecto de la vitrificación en las uniones comunicantes en COCs vitrificados.
- Evaluar la viabilidad y el estado acrosomal de los espermatozoides adheridos al AH o expuestos a la PVP.
- Evaluar la fertilización y el desarrollo embrionario por FIV, ICSI y PICSI en los ovocitos vitrificados.
- Determinar la calidad embrionaria de los blastocistos producidos *in vitro*.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL



COCs= Complejo ovocito-células del cúmulo; DO= Ovocitos denudados; DO-GC= Ovocitos denudados-cocultivo células granulosa.

Figura 7. Esquema general del diseño experimental para evaluar la eficiencia de las técnicas de fertilización.

Los ovocitos en estado inmaduro se dividieron en dos grupos, uno control y el otro experimental. A su vez cada grupo se subdividió en el grupo control COCs, control DO y control DO-GC, y de vitrificación DO-GC. A todos los grupos se les evaluó la viabilidad al T 0 y 44 h. Posteriormente se evaluó la MIV y se fertilizaron por las técnicas de FIV, ICSI y PICSI. Antes de hacer la fertilización se evaluó el estado acrosomal de los espermatozoides a inyectar con ICSI y PICSI, expuestos a PVP y AH, respectivamente. Se evaluó el desarrollo embrionario hasta el estado de blastocisto y se intentó por una ocasión hacer la transferencia de embriones. Para los grupos control COCs y vitrificación COCs, se evaluó la integridad de las uniones comunicantes.

Experimento 1: Evaluación de la viabilidad de los ovocitos, MIV y parámetros de FIV.

Los ovocitos empleados para evaluar cada parámetro corresponden a muestras independientes. Al menos se realizaron cinco experimentos para evaluar la viabilidad y la maduración en ovocitos frescos y vitrificados. La viabilidad se evaluó inmediatamente después de la colecta de los COCs (T 0 h) y al final de la MIV (T 44 h) (Figura 7).

Al menos se realizaron tres réplicas para evaluar los parámetros de FIV: monospermia, activación y polispermia. Después de la MIV los ovocitos se tiñeron para evaluar las tasas de metafase II (MII) en los grupos control COCs, control DO (ovocitos desnudos), control DO-GC y vitrificados. A cada grupo experimental se le realizó posteriormente la fertilización por FIV, ICSI o PICSI.

Experimento 2: Evaluación de las uniones GAP en los ovocitos vitrificados.

Para evaluar el efecto de la vitrificación en las uniones comunicantes, se tuvo un grupo control de COCs sin vitrificar, un control positivo de carbenoxolona di sódica (CBX) 200 μ M y un grupo experimental de COCs vitrificados. Se realizaron 7 ensayos con una n= 25 células por ensayo. Posteriormente se realizó la tinción con calceína para observar bajo microscopía confocal la integridad de las uniones comunicantes entre las células de la granulosa y el ovocito.

Experimento 3: Viabilidad y estado acrosomal espermático.

Se realizaron al menos tres réplicas para comparar la viabilidad y estado acrosomal de los espermatozoides expuestos a la PVP y al AH. El número de espermatozoides por cada

réplica fue de n= 200. La muestra espermática se dividió en tres grupos: 1) Espermatozoides no tratados (Control, n=200), 2) Espermatozoides expuestos a la PVP (ICSI-PVP, n=200) y 3) Espermatozoides expuestos al AH (PICSI-AH, n=200). La evaluación se realizó después de 15 min de exposición en todos los grupos mediante la tinción de isotiocianato de fluoresceína conjugado con aglutinina de maní (FITC-PNA-IP).

Experimento 4: DE y calidad de blastocistos.

Al menos diez réplicas se realizaron para evaluar el DE y tres para la calidad de los blastocistos. Los ovocitos frescos y vitrificados se maduraron y fertilizaron por FIV, ICSI o PICSI. El DE se evaluó a las 48 h, como el porcentaje de división total, y al día 7 la formación de blastocistos. La calidad de blastocistos se evaluó en términos del número total de células, así como de la viabilidad con la doble tinción Hoechst-MTT.

Experimento 5: Transferencia de embriones.

Se seleccionaron dos cerdas de la cruce Landrace x Yorkshire, de edad aproximada de 1.5 años, 120 Kg de peso y con al menos registro de una camada. Se realizó la inducción hormonal y posteriormente los embriones en estado de mórula y blastocisto fueron transferidos a la hembra receptora. Se eligió al grupo experimental de PICSI para realizar las transferencias de los embriones producidos tanto del grupo control COCs como del grupo de vitrificación (Figura 7). El número de embriones para transferir fue de 30 en un cuerno uterino.

8. MÉTODOS

8.1 Establecimiento del sistema de co-cultivo con células de la granulosa

Para establecer el co-cultivo de células de la granulosa, las células antrales se obtuvieron mediante colecta del fluido folicular y las células del cúmulo por denudación mecánica de los COCs. Se obtuvo una concentración total de 1×10^6 células por pozo contenidas en medio de maduración TCM-199. Se tomaron 500 μ L de fluido folicular (conteniendo a las células de la granulosa) y se le agregó 0.1% de hialuronidasa. Las células se colocaron en el vórtex durante 5 min y se lavaron dos veces con PBS para posteriormente centrifugarse a 200 X g durante 5 min a 25 °C. Posteriormente, el paquete celular se resuspendió en medio de maduración para su conteo en la cámara de Neubauer.

8.2 Maduración *in vitro* (MIV)

Se obtuvieron ovarios de cerdas prepúberes de un rastro local (Los Arcos, Edo. de México) con registro federal número 6265375 y se transportaron al laboratorio en un medio de solución salina (0.9% NaCl) a 25 °C. En los ovarios se puncionaron únicamente folículos de 3-6 mm para la obtención del fluido folicular. La muestra se dejó sedimentar durante 20 min. Al paquete celular obtenido se le realizaron dos lavados con medio TL-HEPES-PVA por 15 min cada uno. Después de los lavados, la muestra se colocó en una caja de Petri para realizar la colecta de los COCs. Se prepararon cajas de Petri de lavado a las cuales se les agregó medio de maduración TCM-199 cubierto con aceite mineral. Los ovocitos se lavaron en 3 gotas de TCM-199 para ser colocados en

una caja de cultivo de 4 pozos (Thermo-Scientific Nunc, Rochester NY), la cual contenía gotas de 500 μL de medio TCM-199 suplementado con 0.0033 g de cisteína y 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF), cubiertas con aceite mineral. A cada gota con los COCs se le agregaron 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (5 μL) de LH y FSH respectivamente y se dejaron en incubación durante 44 h a 38.5 °C con 5% CO_2 y humedad a saturación (Ducolomb et al., 2005).

8.3 Vitrificación

Los COCs y DO (ovocitos desnudos) se vitrificaron mediante el siguiente método: los ovocitos se lavaron en medio TCM-199 con PVA, y se expusieron a una mezcla de crioprotectores: EG y DMSO al 7.5%, seguido de la exposición a los mismos crioprotectores con una segunda concentración al 16%, con sacarosa 0.4 M durante 4 min. Se colocaron gotas de 10 μL de la segunda concentración de crioprotectores para colocar los ovocitos en el recipiente Cryolock (Sánchez-Osorio et al., 2010). Los ovocitos se colocaron en el Cryolock cuyo volumen es $<0.1 \mu\text{L}$ y permanecieron 30 min en N_2L para posteriormente calentarse.

8.4 Calentamiento

Para el calentamiento, los ovocitos fueron expuestos a una única concentración de sacarosa (0.13 M) en 850 μL durante 5 min a 38.5 °C (Sánchez-Osorio et al., 2010). Después del calentamiento, la viabilidad se determinó con la tinción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), considerando como vivos a los ovocitos que presentaran una coloración púrpura, y muertos a los no teñidos. Los

ovocitos se maduraron en medio TCM-199 suplementado, durante 44 h a 38.5 °C con 5% de CO₂ y humedad a saturación. Para evaluar la maduración, los ovocitos se tiñeron con 10 mg/mL de bisbenzimidida (Hoechst 33342), un colorante fluorescente de ADN empleado en la microscopía de fluorescencia permeable a la membrana celular con alta afinidad de unión a las pares de bases mostrando la cromatina. Los ovocitos se clasificaron como inmaduros a los que presentaron la VG, en vías de maduración aquellos en metafase I (MI) y madurados aquellos a los que se encontraron en metafase II (MII) en presencia del primer cuerpo polar (Figura 8).

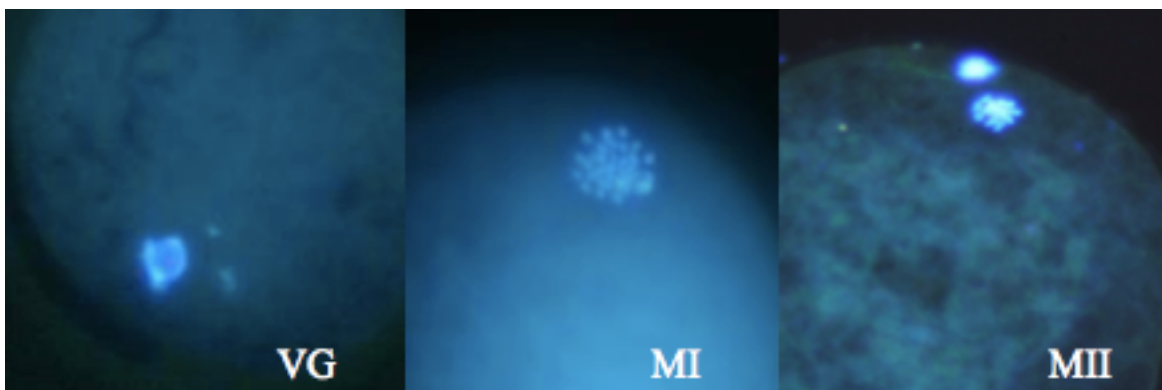


Figura 8. Clasificación de las etapas de maduración en ovocitos.

8.5 Fertilización *in vitro* (FIV)

Después de la MIV, las células del cúmulo fueron removidas con una micropipeta de 100 µL mediante acción mecánica. Los ovocitos desnudos (DO) se lavaron tres veces con medio de maduración TCM-199 y tres veces con el medio amortiguado con Tris modificado (TBMm) en gotas de 500 µL cubiertas con aceite mineral. Para la FIV, se colocaron de 30 a 50 ovocitos en gotas de 50 µL de medio TBMm cubiertas con aceite

mineral y se incubaron a 38.5 °C con 5% de CO₂ y humedad a saturación durante 45 min hasta la inseminación (Ducolomb et al., 2005).

Manejo del semen para la FIV, ICSI y PICS

La muestra de semen se obtuvo mediante el método de la mano enguantada de un verraco de la raza Landrace (localizado en el Estado de México) y se transportó al laboratorio a una temperatura de 16 °C, donde se diluyó 1:1 con solución salina de fosfatos (PBS-Dulbecco. Gibco), suplementada con albúmina sérica bovina (BSA) fracción V al 0.1 %, 75 µg/mL de penicilina potásica G y 50 µg/mL de sulfato de estreptomicina.

Esta suspensión se centrifugó a 61 x g durante 5 min. El sobrenadante se diluyó 1:1 con PBS-Dulbecco y se centrifugó a 1900 x g por 5 min. El sobrenadante se desechó y el paquete celular, conteniendo los espermatozoides, se suspendió en 10 mL de PBS Dulbecco y se centrifugó a 1900 x g por 5 min. El paquete celular se diluyó con 100 µL de TBM y se hizo una dilución y conteo para que, al agregar 50 µL de la suspensión de espermatozoides a la gota del medio de FIV con los ovocitos, se obtuviera una concentración final de 5×10^5 espermatozoides/mL. Para comprobar esta concentración final se realizó el conteo de espermatozoides en una cámara de Neubauer. Se le añadieron 10 µL de la última dilución de espermatozoides a cada cámara. Se realizó el conteo de los cuatro cuadrantes de cada cámara para obtener la concentración deseada. Los ovocitos y los espermatozoides se colocaron en incubación durante 6 h en las condiciones antes descritas (Ducolomb et al., 2005). Después del periodo de co-incubación, los ovocitos se lavaron tres veces en gotas de 50 µL de medio North

Carolina State University-23 (NCSU-23) suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0.4 %; quitando los espermatozoides, se colocaron en gotas de 500 μ L del mismo medio cubiertas con aceite mineral en placas de cuatro pozos, y se incubaron en las mismas condiciones durante 16 h para la evaluación de pronúcleos. Después de 6 h de co-incubación, los ovocitos fertilizados que se utilizaron para evaluar el DE se lavaron y transfirieron a gotas de 500 μ L de medio NCSU-23 y se incubaron a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 48 h y día 7 de incubación, se observaron los embriones para determinar su estado de desarrollo (Ducolomb et al., 2005).

8.6 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

La microinyección se realizó mediante micromanipuladores acoplados a un microscopio invertido con óptica de contraste diferencial de interferencia (Nikon eclipse TE300). Cada micromanupilador presenta la inserción de dos tipos de pipetas: sujeción o "Holding" e inyección. Las pipetas de sujeción presentan un diámetro externo e interno de 150 μ m y 30 μ m, respectivamente. Las pipetas de inyección tienen un diámetro externo de 10 μ m y un diámetro interno de 8 μ m. Ambas pipetas en la punta forman un ángulo de 40⁰, que facilita la manipulación de los gametos.

En una caja de Petri se colocaron ocho gotas de 10 μ L de medio TBM, el cual se preparó 24 h antes y se incubó a 38.5 °C, con 5% de CO₂. Se colocaron 3 ovocitos por cada gota y en el centro se colocó una gota de PVP al 10% (4 μ L), para reducir la velocidad de los espermatozoides y facilitar su captura. Se agregó 1 μ L del medio con espermatozoides obtenidos por "swim up", y en un extremo se colocó una gota de 5 μ L de PVP al 10%, que se utilizó para purgar la pipeta de inyección.

Para la microinyección, con la pipeta de inyección dentro de la gota de PVP, cuidadosamente se inmovilizó a un espermatozoide normal (basándose en la morfología y la movilidad) para ICSI. La inmovilización del espermatozoide se llevó a cabo golpeando hacia abajo con la aguja su flagelo, y la aspiración del espermatozoide se hizo por el extremo del flagelo hacia la pipeta, permitiendo que la cabeza fuera la última porción en entrar a la pipeta de inyección. Posteriormente, ambas pipetas se movieron a la gota que contenía a los ovocitos. Los ovocitos maduros se sujetaron mediante una presión negativa ejercida por la pipeta “holding”, manteniendo el primer cuerpo polar en la posición de las seis o las doce horas del reloj, para evitar que pudiera dañarse. Se expulsó cuidadosamente el espermatozoide desde el interior de la aguja de inyección. Posteriormente, en la posición de las tres horas del reloj en el citoplasma del ovocito, se insertó la aguja con el espermatozoide en la punta, con la finalidad de facilitar la activación del ovocito y confirmar el rompimiento del oolema; se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma hacia la aguja de inyección e inmediatamente después se inyectó nuevamente el citoplasma junto con el espermatozoide dentro del ovocito para asegurar que la inyección se realizara de manera correcta. La micropipeta se extrajo y el ovocito se liberó de la pipeta “holding” (Figura 9).

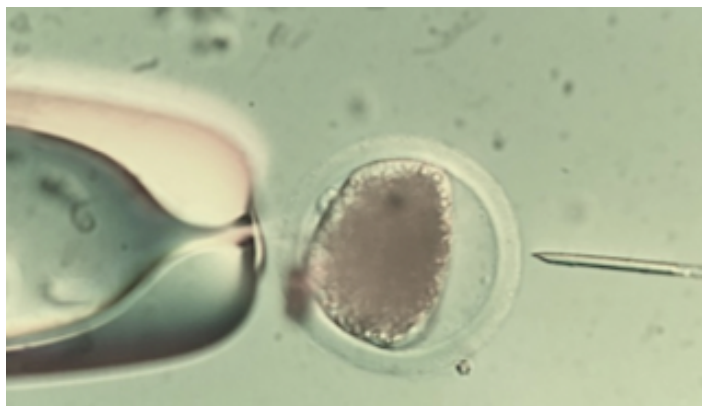


Figura 9. ICSI en ovocito madurado. Imagen obtenida del microinyector con un aumento de 40X.

Los ovocitos microinyectados se lavaron dos veces en medio TBM y se incubaron a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación (Gómez et al., 1997; 1998). Se realizó una tinción con Hoechst 33342 para evaluar la formación de pronúcleos, los parámetros de fertilización y DE.

8.7 Inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides (PICSI)

En el laboratorio se tomó una alícuota de la muestra de semen original para observar los parámetros de viabilidad y movilidad espermática. Se tomaron 10 µL de la muestra y se diluyeron para obtener una concentración de 1×10^5 espermatozoides/mL. En una caja de Petri de PICSI (Figura 10), la cual contiene micro-gotas con AH en gel, se colocaron alrededor de 1-5 µL de la muestra de espermatozoides. La caja de PICSI se incubó durante 15 min a 38.5 °C. Posteriormente se observó en el microinyector para seleccionar a los espermatozoides que se hubieran unido a la gota del AH. Posteriormente se realizó la colecta espermática e inyección intracitoplasmática (Henkel., 2012).

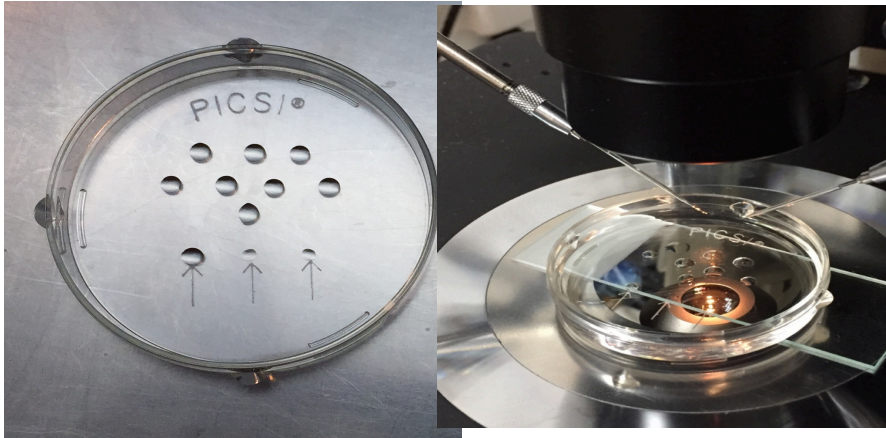


Figura 10. Caja de Petri para PICSI.

8.8 Transferencia embrionaria

Para llevar a cabo la transferencia embrionaria, se seleccionaron dos cerdas resultantes de la cruce entre Landrace x Yorkshire con una edad aproximada de 1.5 años y peso aproximado de 120 Kg. Como criterio de selección fue importante considerar que ya hubieran tenido presencia del ciclo estral y fertilidad probada (al menos una camada). Una vez seleccionadas, se planteó la sincronización hormonal aplicando la superovulación con un agente comercial P.G. 600 (Merck, Alemania). A ambas cerdas se les inyectó el agente inductor que contenía 400 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) + 200 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) en una etapa del ciclo estral diferente al estro. La administración se realizó el miércoles 21 de junio de 2017. El efecto de estas hormonas consiste en estimular a la cerda para reiniciar el estro al 5º día post-inyección, posteriormente se debe dejar pasar el estro con duración de 3 días y, dependiendo del estado de los embriones a transferir, se recomienda para mórula o blastocisto que se realice 6 días post-estro. Se obtuvieron aproximadamente 50

blastocistos producidos por PICSÍ y la TE llevó a cabo el 4 de Julio del 2017 (Figura 11).

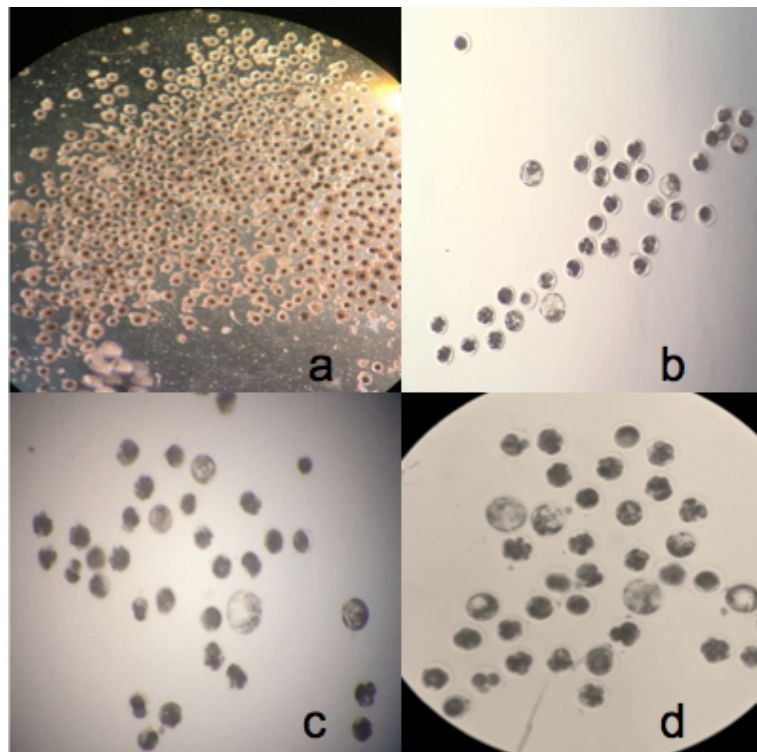


Figura 11. Producción embrionaria para TE. Obtención de ovocitos (a) y Blastocistos producidos por PICSÍ (b-d).

Se seleccionaron los embriones con mejores características morfológicas y se decidió transferir únicamente embriones en estado de mórula y blastocisto. Una vez seleccionados se transportaron a la granja especializada en bovinos y porcinos (Estado de México) a 37 °C en pajillas de 0.25 mL con medio base o “Holding”. Se cargaron aproximadamente 15 embriones/pajilla (Figura 12).

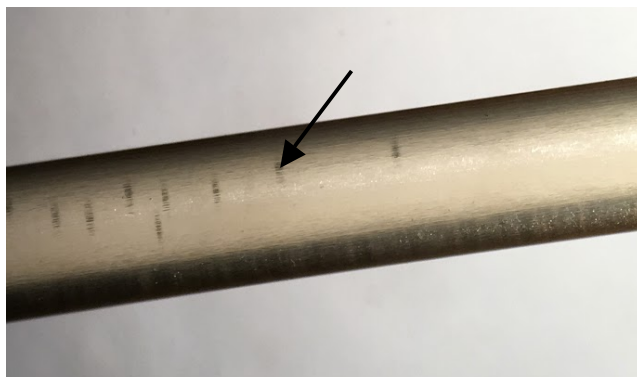


Figura 12. Pajilla de 0.25 mL con embriones (flecha).

Al llegar a la granja se adaptó un espacio para el trabajo de laboratorio con condiciones de esterilidad y sin ventilación, así como el área para la TE quirúrgica. En el laboratorio provisional se seleccionaron aproximadamente 30 embriones en estado de mórula y blastocisto producidos del grupo de vitrificación PICSI y se cargaron en un catéter “Tomcat” con 15 embriones por catéter (Figura 13).

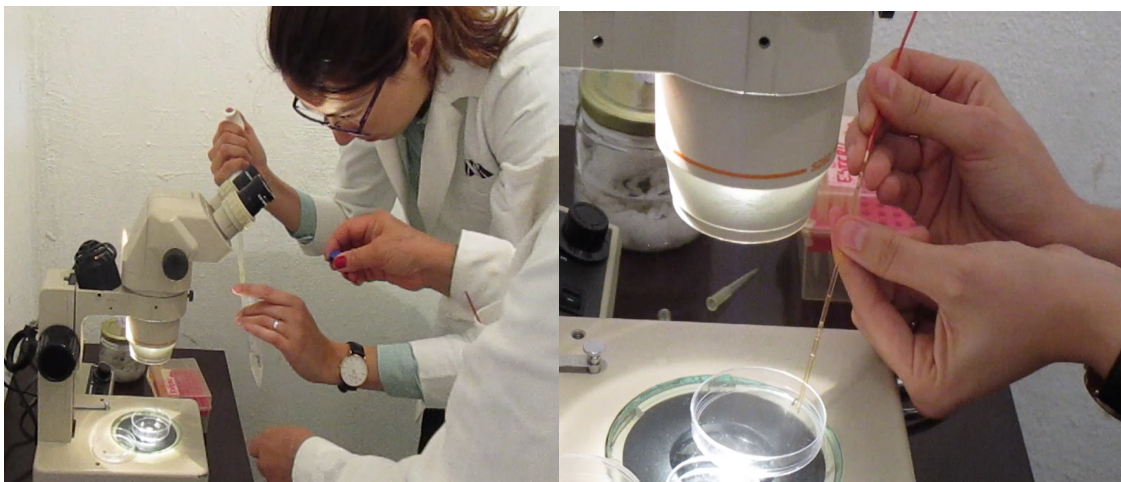


Figura 13. Transferencia de los embriones al catéter “Tomcat”.

Los catéteres se mantuvieron cubiertos tratando de conservar la temperatura del medio “holding”. Una vez terminada la parte experimental, con asistencia veterinaria se llevó a cabo la preparación quirúrgica de las cerdas. Sin embargo, únicamente una de ellas se encontró en etapa de diestro para llevar a cabo la TE (Figura 14). La otra cerda estaba en estro y no respondió a la inducción hormonal por lo que fue descartada.



Figura 14. Cerda receptora.

El proceso quirúrgico se realizó de acuerdo a los lineamientos éticos para el manejo de animales de experimentación establecidos por la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. La anestesia se aplicó vía intramuscular en la región anterior de la oreja de la cerda a la cual decidimos ponerle el nombre de “Peppa”. El agente anestésico fue Zoletil comercial (4.4 mg/Kg peso) + Clorhidrato de ketamicina y xilacina (2.2 mg/Kg peso), preparándose un coctel en 5.5 mL para la inyección. Transcurridos 15 min, hizo efecto la anestesia, y la cerda se colocó en una camilla y se

trasladó al área de cirugía. Se le realizó una incisión medial con una abertura de 4 cm, abordando únicamente la cavidad uterina. Una vez localizada la región uterina para depositar los embriones se realizó una perforación del cuerno uterino con una aguja calibre 18 con punta roma (Figura 15).

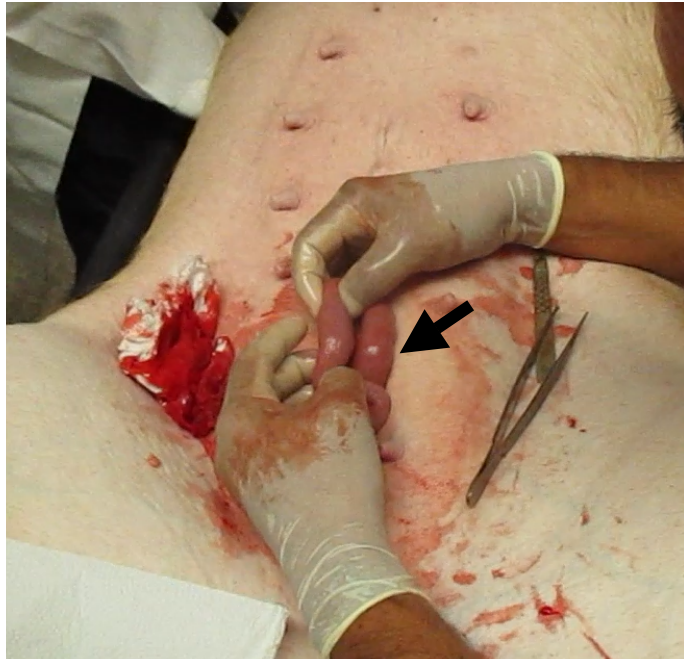


Figura 15. Abordaje en la cavidad uterina, mostrándose uno de los cuernos uterinos (Flecha negra).

Todo el equipo utilizado estaba esterilizado con óxido nitroso. En el orificio se colocó el extremo del “Tomcat” y se inyectaron los embriones únicamente en el cuerno uterino izquierdo debido a que se conoce que en esta especie ocurre un fenómeno de migración hacia ambos cuernos. En total se transfirieron 3 pajillas “Tomcat” del grupo de vitrificación-PICSI con un total de 45 embriones (Figura 16).



Figura 16. TE en el cuerno uterino (flecha negra) (recuadro rojo).

Para la sutura se realizó un punto en X incidiendo grasa y piel con una sutura absorbible dexon del número 1. Al finalizar se colocaron grapas Michel para evitar una posible abertura de la sutura. El procedimiento quirúrgico tuvo una duración aproximada de 1 h. La cerda estuvo 30 min en recuperación y posteriormente se mantuvo en una zona apartada de otros cerdos (Figura 17).



Figura 17. Colocación de grapas Michel para suturación (recuadro rojo).

Transcurridas 3 h se le dieron a la cerda alimento y agua. Durante los días siguientes no presentó manifestaciones de infección por lo que no se le administró ningún antibiótico. Veintiún días después de la TE, se monitoreó la presencia de celo, el cual no ocurrió indicando una posible implantación y gestación. A los dos meses post-TE se procedió a realizar un ultrasonido de tipo lineal encontrándose vesículas embrionarias o cavidades dando indicios de posible gestación. Sin embargo, no se encontró ningún feto evidente. Posteriormente, al tercer mes de gestación, fecha esperada de posible parto, no se obtuvieron nacimientos de crías y la cerda entró en celo.

8.9 Tinciones

8.9.1 Evaluación de la viabilidad y estado acrosomal espermático

La muestra espermática utilizada para ICSI o PICSI se tiñó con yoduro de propidio (IP) y con FITC-PNA para evaluar simultáneamente la viabilidad y el estado acrosomal. Para la evaluación, 5 μ L de la muestra espermática se diluyeron en 100 μ L de TBMm conteniendo 5 μ L de IP: 1000 μ g/mL en agua destilada y 5 μ L de FITC-PNA: 1000 μ g/mL en PBS. La muestra se homogeneizó y se incubó durante 5 min. Posteriormente, 10 μ L de la suspensión se fijaron con 10 μ L de 1.6% de glutaraldehído y se evaluaron en microscopía de fluorescencia (Zeiss Axiostar). La clasificación se realizó de la siguiente manera: vivo con reacción acrosomal (V/RA), muerto con reacción acrosomal (M/RA), vivo no reaccionado (V/NR), muerto no reaccionado (M/NR), *n* número de espermatozoides analizados (Figura 18). La condición ideal para la fertilización es V/RA.

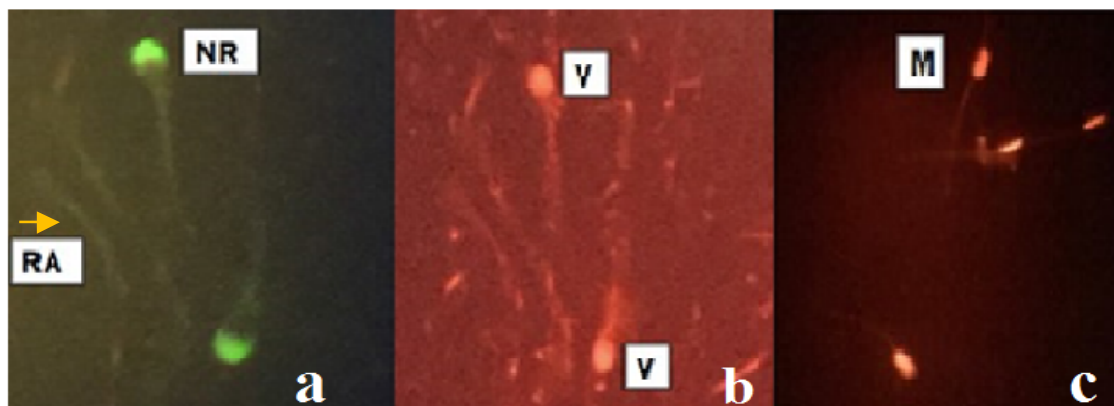


Figura 18. Evaluación de la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides expuestos al AH o PVP.

a: espermatozoide no reaccionado (NR) con fluorescencia verde en el acrosoma; espermatozoide reaccionado (RA) transparente (flecha amarilla). b: espermatozoides vivos (V) transparentes y c: espermatozoides muertos (M) con tinción en rojo.

8.9.2 Evaluación de la viabilidad en ovocitos

La tinción con MTT es un ensayo colorimétrico que consiste en la medición de la actividad de la enzima celular mitocondrial succinato-deshidrogenasa que reduce el colorante, a sales de formazán, dando una coloración púrpura. Para realizar la tinción de MTT, se colocaron 100 μL de MTT en cada pozo de una placa de 4 pozos, que contenía a los ovocitos, y se guardaron en incubación durante 1 h 30 min para su evaluación (Casas et al., 1999).

8.9.3 Evaluación de la MIV y parámetros de fertilización

El Hoechst es un colorante fluorescente con capacidad de teñir el ADN, empleado en la microscopía de fluorescencia para poder determinar el estado de maduración nuclear o citoplásmica de los ovocitos. El colorante es excitado por luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a los 350 nm con un máximo de emisión de alrededor de 461 nm. Es

altamente permeable a la membrana celular con alta afinidad de unión a las pares de bases tiñendo la cromatina.

Después de la MIV o FIV, en el caso de los ovocitos que fueron madurados, se removieron las células de la granulosa por acción mecánica con una pipeta de 100 μ L. Para evaluar la MIV y FIV se agregaron a los ovocitos 500 μ L de fijador glutaraldehído por cada pozo. Se dejaron en fijación durante 20 min, en refrigeración. Posteriormente, los ovocitos se transfirieron a otra caja de 4 pozos y a cada pozo se agregaron 300 μ L de PBS. Se realizó un lavado a los ovocitos para quitar el exceso de PBS para después aplicar 300 μ L de Hoechst por pozo. La caja de 4 pozos se cubrió con papel aluminio y se dejó en refrigeración durante 40-45 min. Nuevamente se lavaron los ovocitos con PBS para quitar el exceso de Hoechst y poder realizar el montaje de la laminilla.

8.9.4 Evaluación de las uniones comunicantes

Para evaluar las uniones comunicantes entre el ovocito y las células del cúmulo durante la MIV, se midió la transferencia de colorante de las células del cúmulo al ovocito utilizando el acetoximetil (AM), el cual es un derivado éster del indicador fluorescente de calceína (calcein-AM; 39,69-Di(Oacetyl)-29,79-bis[N,N-bis(carboxymethyl) aminomethyl]-fluorescein, tetraacetoxy methyl ester; C-3100; Molecular Probes, Eugene, OR). Las uniones comunicantes de los COCs se evaluaron por microscopía confocal mediante la cantidad de calceína transferida al ovocito desde las células del cúmulo a través de estas uniones por difusión pasiva. Los COCs se cultivaron con el colorante durante 15 min. Posteriormente se transfirieron a un medio libre de calceína-AM durante 25 min para permitir el intercambio del colorante entre las células del cúmulo y el ovocito. Los COCs se

lavaron tres veces en PVA al 0.01% (v/v) y en una ocasión en PBS para remover los restos de calceína-AM. Los COCs se montaron en portaobjetos para su observación bajo microscopio confocal (10 por laminilla). Finalmente se empleó la carbenoxolona 100 mM, que es un bloqueador de uniones comunicantes, para confirmar la fluorescencia intra-ovocito dependiente de estas uniones entre los ovocitos y las células del cúmulo (Thomas et al., 2004; Sasseville et al., 2009).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los datos obtenidos de viabilidad, estado acrosomal espermático, uniones comunicantes, MIV, FIV, desarrollo y calidad embrionaria se realizó ANOVA seguida de una prueba *post-hoc* no paramétrica de Duncan de comparación múltiple con respecto al control y entre grupos (Coticchio et al., 2004). Las diferencias en todos los parámetros se consideraron significativas con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

10. RESULTADOS

Experimento 1

Evaluación de la viabilidad de los ovocitos post-vitrificación y post-MIV

En la Figura 19 se muestran los resultados de la evaluación de la viabilidad de los ovocitos, después de la tinción con MTT. Los ovocitos que presenten una coloración púrpura son viables y los incoloros muertos.

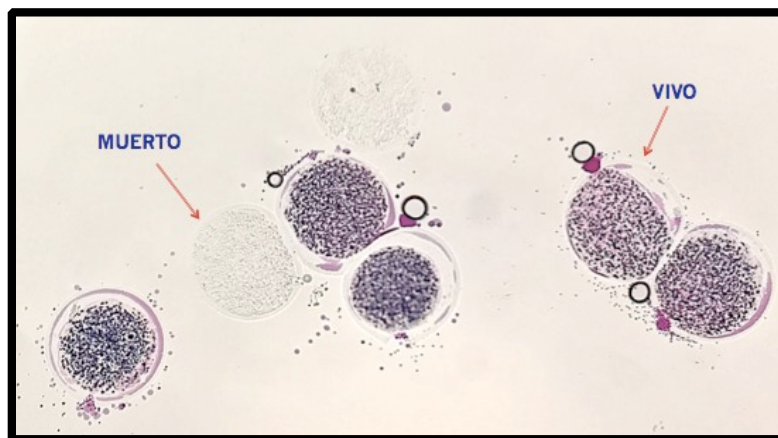


Figura 19. Imagen representativa de la tinción con MTT en ovocitos porcinos después de ser vitrificados, imagen obtenida del microscopio de epifluorescencia en campo claro 40X.

Como se muestra en la Tabla 5, los resultados obtenidos indican que inmediatamente después de la vitrificación, la viabilidad (T 0 h) no disminuyó en comparación con los grupos control COCs, control DO y control DO-GC. Sin embargo, disminuyó drásticamente después de la MIV (T 44 h) hasta un 66% en el grupo de vitrificación. Además, en el control de ovocitos DO, la viabilidad disminuyó significativamente en comparación con los grupos control COCs y control DO-GC.

Tabla 5. Viabilidad de los ovocitos frescos y vitrificados, antes y después de la MIV.

Grupos	Viabilidad T 0 h (%)	Viabilidad después de la MIV T 44 h (%)
Control (COCs)	100/102 (98±0.6) ^a	96/102 (94±0.6) ^a
Control (DO)	78/80 (98±1) ^a	35/50 (70±1.2) ^b
Control (DO-GC)	75/80 (94±0.8) ^a	52/60 (87±2.3) ^a
Vitrificación	65/67 (97±0.2) ^a	44/67 (66±2.1) ^b

COCs Complejo ovocitos-células del cúmulo; DO Ovocitos desnudos; DO-GC Ovocitos desnudos en co-cultivo durante la MIV con células de la granulosa.

Los resultados en porcentaje se presentan como la media ± SD.

^{a,b} Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (P < 0.05).

Evaluación de la MIV en ovocitos frescos y vitrificados

Los resultados de la MIV se observan en la Tabla 6, en donde se muestra que el porcentaje de ovocitos en MII en el control COCs fue mayor que en el grupo vitrificado (87% vs 54%, respectivamente). La MIV se vio drásticamente afectada en el grupo control DO. Comparando los otros estados nucleares como la MI y la VG, se observó que el grupo control DO tuvo mayor porcentaje de ovocitos en VG, al igual que el control DO y control DO-GC en comparación con el grupo control COCs. Los resultados indican que, aunque la MIV se ve comprometida en los ovocitos vitrificados, es posible obtener un 54% de ovocitos en MII, permitiendo llevar a cabo la FIV.

Tabla 6. MIV de ovocitos inmaduros porcinos frescos y vitrificados.

Tratamiento	Total ovocitos n	Ovocitos en MII (%)	Etapas meióticas (%)		
			VG	MI	RVG
Control (COCs)	340	299 (88±0.2) ^a	6 (2±0.8) ^a	35 (10±0.2) ^a	334 (98±0.9) ^a
Control (DO)	90	10 (11±3.2) ^b	62 (69±4) ^b	18 (20±2.1) ^b	28 (31±1.9) ^b
Control (DO-GC)	100	46 (46±4) ^c	49 (49±1.8) ^c	5 (5±0.3) ^a	51 (51±1.2) ^c
Vitrificación	121	65 (54±1.2) ^c	44 (36±4.3) ^c	12 (10±0.6) ^a	77 (64±3.2) ^c

COCs Complejo ovocitos-células del cúmulo; *DO* Ovocitos desnudos; *DO-GC* Ovocitos desnudos en cultivo durante la MIV con células de la granulosa; *VG* Vesícula germinal; *MI* Metafase I; *MI* Metafase II; *RVG* Rompimiento de vesícula germinal (MI + MII); *n* número de ovocitos examinados.

Los resultados en porcentaje se presentan como la media ± SD.

^{a,b,c} Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Evaluación de los parámetros de fertilización

La evaluación de la fertilización mediante la doble tinción de Hoechst + MTT, permitió determinar el número de pronúcleos (PN) y cuerpos polares (PB) (Figura 20).

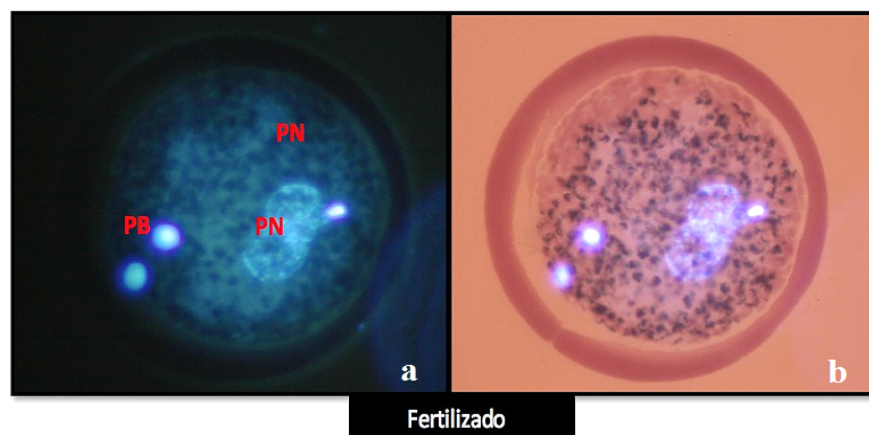


Figura 20. Imagen representativa del parámetro de fertilización por la tinción de Hoechst. a) Presencia de dos pronúcleos (PN) y dos cuerpos polares (PB) que indican que el ovocito fue fertilizado y b) tinción de MTT con coloración púrpura indica vivo.

Los resultados de la FIV mostraron diferencia significativa en el porcentaje de ovocitos activados (ovocitos con dos PB y un PN) contra los grupos control COCs y vitrificados. Sin embargo, con la técnica de ICSI, se obtuvo un menor porcentaje de activación en el grupo de vitrificación en comparación con el de ovocitos vitrificados y fertilizados por PICS. En lo que respecta a la presencia de ovocitos monospermicos (con dos PB y dos PN), el grupo control COCs y el de vitrificación con FIV mostraron mayores tasas que los grupos de ICSI y PICS tanto en el control como en los vitrificados ($P < 0.05$) (Tabla 7). En cuanto a la observación de polispermia, se obtuvieron menores tasas en los grupos de vitrificación en comparación con los controles.

Tabla 7. Parámetros de fertilización en ovocitos frescos y vitrificados.

Grupos	Total Ovocitos	Activados (%)	Monospermia (%)	Polispermia (%)	No fertilizados (%)
FIV					
Control (COCs)	70	10 (14±2) ^a	45 (64±1.5) ^a	15 (21±1.3) ^a	-
Control (DO)	35	5 (14±2.8) ^a	2 (6±2.1) ^b	9 (26±3) ^a	19 (54±5) ^a
Control (DO-GC)	41	10 (24±1.2) ^b	21 (51±3.4) ^a	8 (20±5) ^a	2 (5±1.3) ^b
Vitrificación	62	16 (26±3.2) ^b	38 (61±4.3) ^a	8 (13±2.8) ^b	-
ICSI					
Control (COCs)	49	8 (16±7) ^a	20 (41±12) ^c	-	21(43±0.7) ^a
Control (DO)	30	4 (13±2) ^a	3 (10±0.8) ^b	-	23 (77±10) ^c
Control (DO-GC)	30	5 (17±8) ^a	10 (33±4.2) ^c	-	15 (50±1.1) ^a
Vitrificación	43	3 (7±1.9) ^c	15 (35±8) ^c	-	25 (58±1.2) ^a
PICSI					
Control (COCs)	65	10 (15±4.5) ^a	32 (49±10) ^c	-	23 (35±2.6) ^d
Control (DO)	45	2 (4±0.6) ^c	1 (2) ^b	-	42 (93±2.2) ^c
Control (DO-GC)	45	10 (22±4) ^b	22 (49±9.9) ^c	-	13 (29±6.2) ^d
Vitrificación	40	8 (20±3) ^b	18 (45±5.6) ^c	-	14 (35±1.4) ^d

COCs Complejo ovocitos-células del cúmulo; *DO* Ovocitos desnudos; *DO-GC* Ovocitos desnudos en cultivo durante la MIV con células de la granulosa; *PBs* cuerpos polares; *PN* pronúcleo; *Activados* Ovocitos con un PN; *Monospermia* Ovocitos con dos PBs y dos PN; *Polispermia* Ovocitos con más de tres PN; *No fertilizados* Ovocitos sin presencia de PBs y PN, *n* Número de ovocitos examinados

Los resultados en porcentaje se presentan como la media ± SD.

^{a,b,c,d} Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Experimento 2

Evaluación del efecto de la vitrificación en las uniones comunicantes de los ovocitos

Se realizaron experimentos en sextuplicado para evaluar el efecto de la vitrificación en las uniones comunicantes. En términos de intensidad de fluorescencia, existe una diferencia significativa entre el grupo de vitrificación y los controles (Figura 21). Los resultados demuestran que la vitrificación causa alteraciones en las uniones comunicantes en algunos ovocitos. Sin embargo, el daño es variable y no compromete al 100%. Los resultados obtenidos están estrechamente relacionados con los porcentajes de MIV reportados previamente por la vitrificación de COCs (Casillas et al., 2014). Este estudio señala que las células del cúmulo pierden su viabilidad y que, al ser fundamentales en el proceso de maduración, ejercen un efecto negativo al comprometer el desarrollo del ovocito.

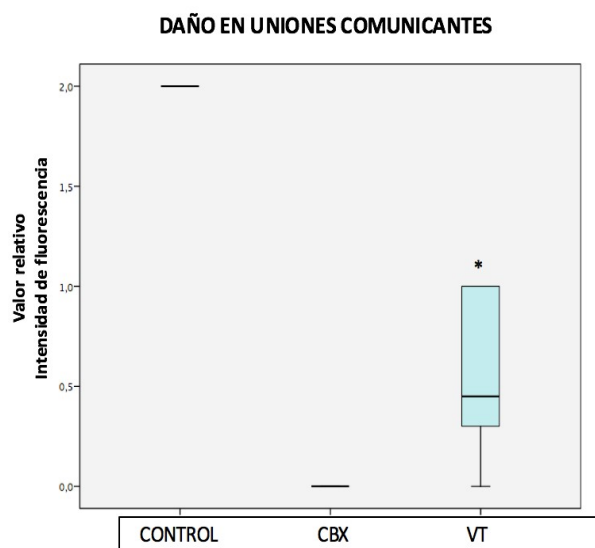


Figura 21. Intensidad de la fluorescencia para la evaluación de las uniones comunicantes en ovocitos vitrificados y expuestos a CBX. * Indica diferencia significativa con respecto a los controles. *CBX* Carbenoxolona di sódica, *VT* Vitrificados.

En la Figura 22, se muestran las imágenes de los ovocitos analizados con microscopía confocal, las cuales mostraron la intensidad de fluorescencia por la migración de calceína. En el grupo control se observó la presencia de calceína en el citoplasma del ovocito, en el grupo con CBX, ausencia de calceína en el ovocito y en el grupo vitrificado hubo daño en las células de la granulosa, así como una disminución en la intensidad de calceína o ausencia total en el ovocito.

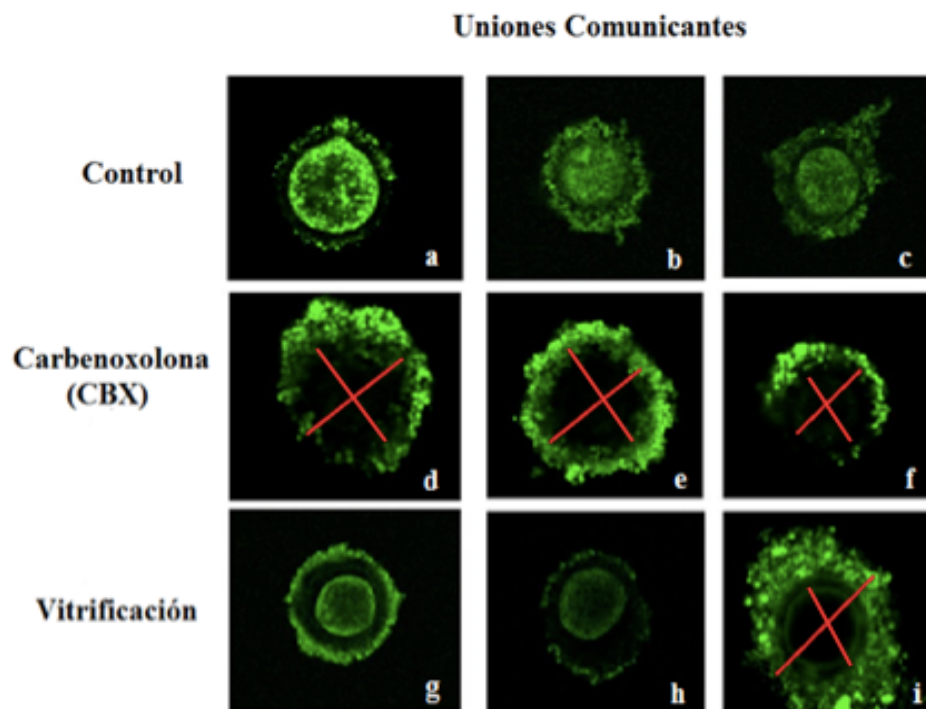


Figura 22. Tinción con calceína para evaluar las uniones comunicantes en COCs vitrificados. Los ovocitos se evaluaron a las 2 h de su obtención. En el grupo control se observa la migración de la calceína al citoplasma (a,b,c). Cuando se utilizó al inhibidor de uniones comunicantes (CBX), no se presentó migración de la calceína al citoplasma de los ovocitos (línea roja) (d,e,f). En el grupo de vitrificación, en algunos ovocitos (g y h) hubo migración de calceína, pero en otros no hubo migración (línea roja) (i).

Experimento 3

Viabilidad y estado acrosomal espermático después de la exposición a la PVP y AH.

Los resultados mostraron que los tratamientos con PVP o AH aplicadas a las técnicas ICSI-PVP y PICSI-AH mostraron diferentes efectos ($P < 0.05$) comparados con el grupo control en el porcentaje de espermatozoides V/RA (Tabla 5). Se obtuvieron mayores tasas de V/RA en el grupo de PICSI-AH comparado con los grupos control y PVP ($P < 0.05$). En lo que respecta a los espermatozoides M/RA, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y PICSI-AH. Además, los resultados demostraron que la exposición de los espermatozoides a la PVP afectó significativamente la viabilidad y la RA. Es importante resaltar que en el grupo PICSI-AH se obtuvieron menores tasas de V/NR después de la exposición al AH comparados con el grupo control y el grupo ICSI-PVP. Adicionalmente, no se obtuvieron diferencias significativas en todos los grupos en los porcentajes de M/NR (Tabla 8).

Tabla 8. Viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides seleccionados para ICSI o PICSI.

Técnicas	Total espermatozoides n	V/RA (%)	M/RA (%)	V/NR (%)	M/NR (%)
Control	600	432 (72±1.4) ^a	29 (5±1.4) ^a	108 (18±1.8) ^a	31 (5±0.4) ^a
ICSI-PVP	600	319 (53±0.9) ^b	180 (30±1.1) ^b	82 (14±2.3) ^a	19 (3±0.2) ^a
PICSI-AH	600	504 (84±2.3) ^c	50 (8±1.9) ^a	42 (7±1.8) ^b	4 (1±0.3) ^a

ICSI Inyección intracitoplasmática de espermatozoides; *PICSI* Inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides; *PVP* Polivinilpirrolidona; *AH* Ácido Hialurónico; *V/RA* Vivo con reacción acrosomal; *M/RA* muerto con reacción acrosomal; *V/NR* Vivo no reaccionado; *M/NR* Muerto no reaccionado; *n* número de espermatozoides analizados.

El porcentaje de los datos está representado como la media \pm SD.

^{a,b,c}Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$), prueba de Duncan.

Experimento 4

Efecto de la vitrificación en el desarrollo embrionario y formación de blastocistos.

La vitrificación no afectó el desarrollo embrionario obtenido con las técnicas de FIV, ICSI y PICSI en comparación con el control COCs y control DO-GC, respectivamente. Sin embargo, disminuyó drásticamente con respecto al control DO en todas las técnicas de fertilización. Además, no se obtuvieron diferencias significativas entre el control COCs, control DO-GC y vitrificación con PICSI en comparación con la FIV. En cuanto al desarrollo de blastocistos, en los grupos control COCs, control DO-GC, y vitrificación con PICSI se obtuvieron mayores porcentajes que los obtenidos por FIV e ICSI ($P < 0.05$). Se obtuvo una menor tasa de blastocistos con ICSI. La calidad de los blastocistos también fue evaluada y los resultados indican que la viabilidad fue menor en aquellos obtenidos por FIV y vitrificación seguida de ICSI en comparación con los de PICSI. En la Tabla 9 se muestra que todos los blastocistos obtenidos a partir de PICSI presentaron 100% de viabilidad de sus blastómeros en comparación con los obtenidos por FIV e ICSI. En resumen, mayores tasas de viabilidad y número de núcleos se obtuvieron en los grupos control COCS y vitrificados PICSI en comparación con FIV e ICSI (Figuras 23 y 24). Únicamente aquellos blastocistos con el total de sus blastómeros teñidos fueron considerados vivos.

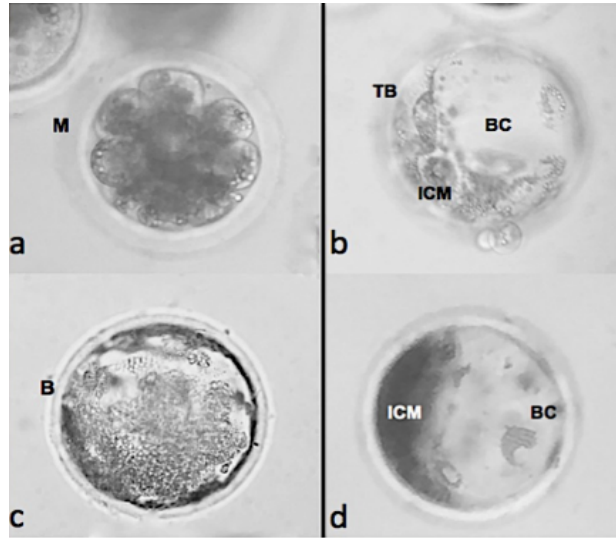


Figura 23. Producción embrionaria. Mórula (a) y blastocistos obtenidos a partir de ovocitos vitrificados (b, c y d). Las imágenes se obtuvieron en microscopio invertido con 400 X. *M* Mórula; *TB* Trofoblasto; *B* Blastocisto; *BC* Cavidad blastocisto; *ICM* Masa celular interna.

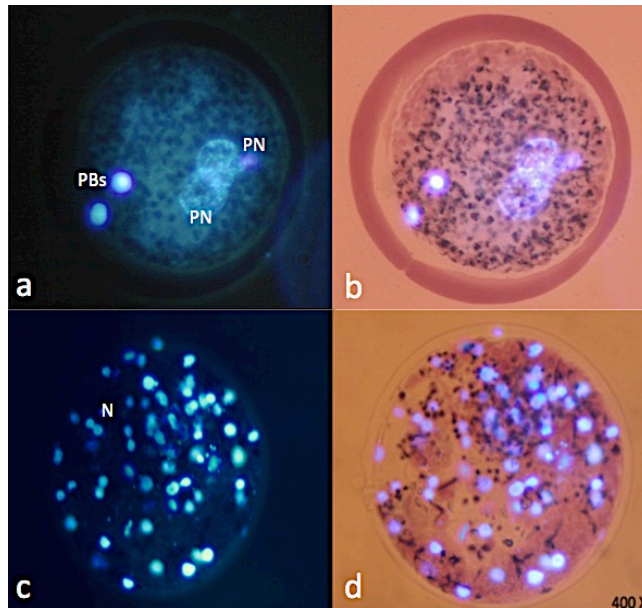


Figura 24. Fertilización y calidad de blastocistos con la doble tinción Hoechst-MTT. Ovocito vivo fertilizado (a,b). Blastocisto vivo (c,d). *PBs* cuerpos polares, *PN* pronúcleo, *N* Núcleo. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de fluorescencia a 400 X.

Tabla 9. Desarrollo embrionario *in vitro*, formación y calidad de blastocistos.

Grupos	Total Ovocitos n	División (%)	Blastocistos (%)	Viabilidad (%)	No. de núcleos (media ± SD)
FIV					
Control (COCs)	250	202 (81±1.3) ^a	29 (12±2.4) ^a	27 (93±1) ^a	52±2 ^a
Control (DO)	115	6 (5±2.1) ^b	1 (1) ^b	1 (100) ^a	44±3.1 ^a
Control (DO-GC)	100	73 (73±3.4) ^a	15 (15±1.2) ^a	13 (87±4) ^b	50±0.6 ^a
Vitrificación	210	142 (68±2) ^a	30 (14±1.8) ^a	23 (77±0.6) ^b	46±3 ^a
ICSI					
Control (COCs)	120	64 (53±13) ^c	6 (5±0.3) ^b	6 (100) ^a	49±5 ^a
Control (DO)	65	-	-	-	-
Control (DO-GC)	74	33 (45±2) ^c	9 (12±0.3) ^a	9 (100) ^a	44±0.9 ^a
Vitrificación	113	45 (40±9) ^c	4 (9±0.2) ^b	2 (50±0.2) ^c	41±2 ^a
PICSI					
Control (COCs)	175	112 (64±10) ^a	38 (22±1) ^c	38 (100) ^a	59±2 ^b
Control (DO)	60	-	-	-	-
Control (DO-GC)	60	38 (63±2) ^a	18 (30±1.5) ^c	18 (100) ^a	50±2.5 ^a
Vitrificación	158	99 (63±3.5) ^a	39 (25±3) ^c	39 (100) ^a	54±5 ^b

COCs Complejo ovocitos-células del cúmulo; *DO* Ovocitos desnudos; *DO-GC* Ovocitos desnudos en cultivo durante la MIV con células de la granulosa; *n* Número de ovocitos examinados.

Los resultados en porcentaje se presentan como la media ± SD.

^{a,b,c} Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Experimento 5: Transferencia embrionaria

Se realizó la transferencia de los embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos inmaduros vitrificados y fertilizados por PICSI (grupo experimental) a una hembra receptora, la cual respondió a la inducción hormonal. A los doce días post inducción hormonal, en etapa de diestro, el 4 de julio de 2017 se transfirieron aproximadamente 45 embriones en estado de mórula o blastocisto en uno de los cuernos uterinos por vía

quirúrgica. Después de la cirugía, la cerda mostró signos vitales adecuados, así como un incremento en la ingesta de alimento en los próximos 20 días sin volver a presentar celo. Ésto nos permitió intuir que había implantación, la cual se corroboró mediante ultrasonido lineal en septiembre de 2017 (60 días post-TE). El resultado del ultrasonido mostró vesículas o cavidades embrionarias (flechas) en donde se aloja y desarrolla cada feto. Sin embargo, no se observó ninguna figura fetal (Figura 25). Los resultados mostraron entonces que únicamente se pudieron registrar 3 implantaciones, sin embargo, en ninguna de ellas hubo indicio de fetos.



Figura 25. Ultrasonografía lineal, vesículas o cavidades embrionarias sin presencia fetal (flechas rojas).

11. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una comparación de la eficiencia de las TRA en la fertilización y DE de los ovocitos inmaduros frescos y vitrificados de la especie porcina. Además, es la primera vez que se reporta la eficiencia de la técnica de PCSI en ovocitos porcinos vitrificados para la obtención de embriones en estado de blastocisto.

Con respecto a las evaluaciones realizadas en los ovocitos (Experimento 1), los resultados mostraron que la viabilidad no se afectó inmediatamente después del calentamiento (T 0 h). Sin embargo, sí se afectó drásticamente después de la MIV (T 44 h) en los grupos de ovocitos vitrificados y del control DO. Estos resultados confirman los reportados anteriormente (Begin et al., 2003; Somfai et al., 2006), en donde la viabilidad de los ovocitos de cerdas y cabras disminuye después de la MIV. Lo anterior podría explicarse debido a que se ha reportado que durante el cultivo *in vitro*, los niveles de O₂ y de especies reactivas de oxígeno incrementan, afectando la viabilidad celular (Bedaiwy et al., 2004). Asimismo, los ovocitos en estado de VG son altamente crio-sensibles durante el proceso de vitrificación, en comparación con otros estados de desarrollo. Los ovocitos porcinos vitrificados en VG, presentan un alto contenido lipídico intracelular, lo cual impide la permeabilidad y capacidad de protección de los crioprotectores intracelulares, afectando la viabilidad celular (Fasano et al., 2012). Por lo que, una alta cantidad de lípidos intracelulares afecta en los ovocitos vitrificados los niveles de glutatión, lo cual incrementa la producción de H₂O₂, la generación de estrés oxidante, disminuyendo la viabilidad celular (Somfai et al., 2007). También, se ha reportado que mientras avanza la división meiótica en el ovocito e inicia la división mitótica durante el DE, la cantidad de

lípidos disminuye debido a que se incrementan las necesidades metabólicas del ovocito. En consecuencia, los embriones de mamíferos sufren un menor daño por vitrificación en comparación con los estados inmaduros. Por otra parte, se ha reportado que la distribución cromosómica, el citoesqueleto y el arreglo mitocondrial son extremadamente sensibles a las bajas temperaturas, especialmente en ovocitos en estado de VG (Rojas et al., 2004). Además, se han obtenido altos porcentajes de cromosomas dispersos y distribución anormal de los filamentos de actina en ovocitos vitrificados, afectando las tasas de recuperación y viabilidad (Wu et al., 2006). Sin embargo, en este trabajo, aunque la viabilidad disminuyó después de la MIV, los porcentajes obtenidos son mayores a los reportados anteriormente (Somfai et al., 2010; Fernández-Reyes et al., 2012) debido a que se evitó la vitrificación de COCs y se empleó un sistema de co-cultivo durante la MIV. Los resultados mostraron que la viabilidad disminuyó significativamente en el grupo control DO después de la MIV, lo que indica que los ovocitos DO son más susceptibles a sufrir daño celular debido a que las células del cúmulo están directamente involucradas en el proceso de reanudación meiótica (Appeltant et al., 2016). La presencia de estas células protege a los ovocitos contra el estrés oxidante (Tatemoto et al., 2000), lo cual explica el por qué en los DO vitrificados se afectó totalmente la viabilidad.

En cuanto a la evaluación de la MIV en ovocitos frescos y vitrificados, los resultados confirman los reportados previamente por Somfai et al., (2014) en donde la vitrificación de ovocitos DO-GC afectó significativamente la MIV. Estos resultados coinciden con algunos estudios que han reportado previamente tasas desde el 13 al 61% de MIV después de la vitrificación de ovocitos en estado de VG, empleando diferentes métodos de criopreservación (Fujihira et al., 2004; Somfai et al., 2010; Fernández-Reyes et al.,

2012; Somfai et al., 2014). Aunque en el presente trabajo, la vitrificación afectó las tasas de MIV, fue posible obtener tasas de maduración del 88% en ovocitos frescos y 54% en vitrificados. Un factor importante que debe considerarse es que en la mayoría de los protocolos de vitrificación reportados en ovocitos en etapa de VG, se realiza conservando los COCs intactos. Por lo que, se ha reportado que la vitrificación de COCs reduce su potencial de maduración debido a los efectos negativos que se producen en las células del cúmulo causados por los crioprotectores, que afectan posiblemente las uniones comunicantes y por lo tanto la maduración. En este estudio no se realizó la vitrificación de COCs sino que se empleó un sistema de co-cultivo con células de la granulosa (Casillas et al., 2014). Sin embargo, aunque se añadió el sistema de co-cultivo durante la MIV, los efectos causados por la vitrificación sugieren daños a distintos niveles: al citoesqueleto, el huso meiótico, a las mitocondrias y al ADN, los cuales podrían explicar los bajos porcentajes de MIV (Rojas et al., 2004; Fernández-Reyes et al., 2012). Además, como se esperaba, los ovocitos del control DO tuvieron una disminución de las tasas de MIV. Esto podría deberse a que si las células del cúmulo son removidas, las uniones comunicantes se alteran y la comunicación celular se interrumpe afectando tanto la viabilidad como la maduración (Amano et al., 2005). Por lo anterior, se demostró que el añadir células de la granulosa en el control DO-GC permite obtener tasas de maduración de hasta el 46% y en los ovocitos vitrificados del 54%. Esto podría deberse a que se ha reportado que el co-cultivo de ovocitos DO con células del cúmulo puede parcialmente promover su capacidad de desarrollo debido a que estas células poseen un mecanismo regulador de pH durante el cultivo *in vitro* además de propiedades antioxidantes que favorecen la MIV (Godard et al., 2009; Yu-Hung et al., 2009). Como se mencionó anteriormente, los resultados de estudios realizados por nuestro grupo de investigación

nos han permitido diseñar un protocolo de vitrificación que ofrece mejores ventajas (Casillas et al., 2014). Con base en nuestra experiencia, consideramos importante evaluar el por qué disminuyen las tasas de MIV en COCs vitrificados y confirmar la existencia del daño en las uniones comunicantes. Para esto, se evaluó si la vitrificación causaba daño en las uniones comunicantes entre el ovocito y las células de la granulosa. Hasta el momento, no se ha reportado el daño en uniones comunicantes en COCs porcinos vitrificados. Los resultados demostraron que la vitrificación sí causa daño en uniones comunicantes de los COCs vitrificados (Experimento 2), disminuyendo drásticamente las tasas de MIV. Aproximadamente un 50% de los COCs vitrificados presentó daño en las uniones comunicantes, lo que impidió que el ovocito lograra la reanudación meiótica. Por lo tanto, estos resultados confirmaron que la vitrificación de COCs impide alcanzar mayores tasas de MIV debido al daño en las uniones comunicantes. Nuestros resultados coinciden con los reportados por otro estudio, en donde se analizó el efecto citotóxico producido en las uniones comunicantes por la exposición de los COCs a compuestos perfluorados durante la MIV (Domínguez et al., 2016). En este estudio se demostró que las uniones comunicantes sí se ven afectadas y, como consecuencia, la MIV disminuye. Debido a que durante la vitrificación, el uso de sustancias citotóxicas (crioprotectores) es necesario, nuestros resultados confirman lo previamente reportado por Domínguez et al., (2016).

Además de la evaluación de los daños causados por la vitrificación en los ovocitos, otro aspecto esencial para determinar la eficiencia de las TRA, es la selección espermática que se realiza en cada una de las TRA. Por lo anterior, se evaluaron los porcentajes de viabilidad y estado acrosomal de los espermatozoides expuestos a la PVP o seleccionados

con AH (Experimento 3). Los resultados mostraron que los espermatozoides seleccionados con AH tuvieron mayores tasas de viabilidad y reacción acrosomal (V/RA) en comparación con el grupo control y con aquellos expuestos a PVP. Estos resultados coinciden con los reportados anteriormente por Wei et al., (2016). Los espermatozoides que fueron expuestos a PVP presentaron altas tasas de espermatozoides muertos que estaban reaccionados M/RA comparados con los seleccionados con AH y el control, lo que indica que el AH puede ser otro método que reemplace el uso de la PVP. En relación con lo anterior, se reportó que la PVP es capaz de disminuir la formación de PN, así como el desarrollo de blastocistos (Wei et al., 2016). La PVP en el procedimiento de ICSI, es tóxica para el espermatozoide, lo que reduce su capacidad fertilizante (Kato y Nagao., 2012). Por lo anterior, nuestros resultados sugieren que la viabilidad espermática es menos afectada cuando los espermatozoides son expuestos al AH en comparación con la PVP. Esto se debe a que el AH es una sustancia producida de manera natural y que durante los procesos de fertilización *in vivo*, los espermatozoides están en contacto sin alterar su morfofisiología. En cuanto a este hallazgo, también se ha reportado previamente que durante la espermiogénesis, se forman los receptores al AH, los cuales están implicados en el potencial de fertilización al poder reconocer a las células del cúmulo (Huszar., 2011). Este hecho sugiere que la unión al AH está relacionada con la maduración y capacitación espermática. Los tratamientos espermáticos convencionales previos a la fertilización como son los lavados, la centrifugación, el “swim-up” o la selección observacional por espermatobioscopia, tienen limitaciones importantes. Todos estos procedimientos no tienen la capacidad de seleccionar espermatozoides funcionales, maduros o competentes, lo que reduce la posibilidad de seleccionar a los espermatozoides aptos para fertilizar. Por tal motivo, se ha reportado que los espermatozoides capaces de

fertilizar a un ovocito son aquellos que han logrado conservar su viabilidad, han madurado y han sido capacitados (Huszar et al., 2003). El éxito de la fertilización está directamente asociado al papel del AH en la selección espermática. Nuestros resultados demuestran que mayores tasas de espermatozoides V/RA se obtienen después de su exposición al AH. En apoyo a lo anterior, también se ha reportado que en el fluido oviductal de cerdas, se han encontrado altas cantidades de AH, lo que indica que este glucosaminoglucano está en contacto con los espermatozoides en su paso por el oviducto, posiblemente ayudando a mantener su viabilidad hasta el sitio de la fertilización (Ulbrich et al., 2004). Las interacciones entre el fluido oviductal y los espermatozoides son necesarias para la capacitación y la fertilización. Únicamente los espermatozoides maduros tienen receptores específicos al AH y, al unirse con éste, promueven la actividad de la enzima hialuronidasa, el reconocimiento de la ZP y la reacción acrosomal (Henkel., 2012).

En relación con los resultados de fertilización, nuestro grupo de investigación ha realizado estudios previos para incrementar las tasas de FIV y DE a partir de ovocitos porcinos vitrificados en VG (Casillas et al., 2014; Casillas et al., 2015). Sin embargo, los porcentajes de producción de embriones siguen siendo bajos, debido a la alta incidencia de daños causados por los protocolos de vitrificación-calentamiento (Rojas et al., 2004; Somfai et al., 2014). En el presente trabajo los resultados mostraron que es posible obtener altas tasas de fertilización monospermica después de la FIV en los grupos control COCs y después de la vitrificación (64 y 61%, respectivamente) en comparación con otros estudios en los que se utilizaron también ovocitos vitrificados en etapa de VG (43 y 33%, respectivamente) (Somfai et al., 2010), o frescos (23 y 13%, respectivamente)

(Romar et al., 2012; Appeltant et al., 2015). Más aún, en este estudio no se tuvieron diferencias significativas entre el control DO-GC y los ovocitos vitrificados. Sin embargo, la fertilización fue significativamente menor en el control DO, sin importar el método de fertilización.

Un factor importante que contribuye a la obtención de altas tasas de fertilización es la calidad y concentración espermática utilizadas para la FIV. En este trabajo, la concentración espermática fue menor a la reportada en otro estudio (2×10^6 espermatozoides/mL) (Appeltant et al., 2015), permitiendo una mayor eficiencia de fertilización. Es importante mencionar que, en ovocitos vitrificados, el endurecimiento de la ZP reduce las tasas de polispermia. Por lo que, se obtuvieron menores tasas de polispermia en el grupo de vitrificación en comparación con los grupos control. En cuanto a las tasas de monospermia, los resultados obtenidos fueron similares a los previamente reportados en otro estudio (64 vs 65%, respectivamente) (Somfai et al., 2015). Por lo tanto, los resultados de este trabajo indican que el método de FIV permite tener mejores tasas de fertilización monospermica en ovocitos vitrificados. Sin embargo, cuando se realizó la ICSI o PICS, se obtuvieron tasas de fertilización significativamente menores en comparación con la FIV. Esto sugiere que la eficiencia de la fertilización disminuye después de la inyección intracitoplasmática, lo cual se ha atribuido a una disminución en la activación de los ovocitos, fallas en la descondesación de la cabeza espermática y disminución de la formación del PN masculino (García-Mengual et al., 2015). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en cuanto a la evaluación de la viabilidad y estado acrosomal espermático debido a que la exposición de los espermatozoides a la PVP disminuye la formación del PN masculino.

La eficiencia de la ICSI ha sido estudiada previamente, y los resultados obtenidos en otros estudios muestran una eficiencia de fertilización monospermica de 55% en ovocitos frescos que pueden incrementarse hasta un 72% con sustancias como la roscovitina (es una purina inhibidora del MPF sin comprometer la maduración citoplásmica) (García-Roselló et al., 2006). En otro estudio, para incrementar la eficiencia de la ICSI, se realizó la activación del ovocito y se realizó la selección espermática con ZP. Sin embargo, las tasas de fertilización reportadas en este estudio fueron bajas en la especie ovina (Hernández-Pichardo et al., 2016). También, para incrementar la eficiencia de la ICSI, recientemente se ha reportado que con el uso de lipasa para seleccionar e inyectar ovocitos se puede obtener una tasa de fertilización monospermica del 29% (Wei et al., 2016). Ese estudio también evaluó la eficiencia de la PVP, obteniendo un 24% de monospermia (Wei et al., 2016), similar al obtenido en este trabajo (35%). Sin embargo, los resultados demuestran que el uso del AH puede incrementar la fertilización monospermica hasta un 45%. Considerando los resultados logrados con la ICSI, la necesidad de incrementar la eficiencia de la fertilización nos permitió generar la hipótesis de que la selección espermática juega un papel muy importante en la FIV y el DE. El éxito de la fertilización depende de la calidad del espermatozoide seleccionado para la inyección intracitoplasmática, lo cual no se considera para la realización de la ICSI.

En los resultados obtenidos en cuanto al DE (Experimento 4), la producción total de embriones, así como de blastocistos después de la FIV en los grupos control COCs (81 y 12%, respectivamente) control DO-GC (73 y 15%, respectivamente) y en ovocitos vitrificados (68 y 14%, respectivamente) son mayores a los reportados previamente en cuanto a la obtención de blastocistos producidos a partir de ovocitos porcinos vitrificados

en estado de VG (4.6-5.2%) (Somfai et al., 2014; Somfai et al., 2015). En el grupo control DO, las tasas de desarrollo y de blastocistos fueron significativamente bajas. Al comparar la eficiencia de la división embrionaria total entre los procedimientos de fertilización, la FIV y la PICSI no fueron significativamente diferentes. Sin embargo, en cuanto a la producción de blastocistos después de la ICSI, estudios previos realizados en ovocitos frescos reportan resultados similares (4-14%) (Fujihira et al., 2004; García-Roselló et al., 2006) a los obtenidos en este trabajo (5-12%). También se ha reportado que el uso de la lipasa como pretratamiento para la ICSI permite obtener tasas de blastocistos del 19% (Wei et al., 2016). Sin embargo, cuando se realizó la PICSI con espermatozoides seleccionados con AH, la producción de blastocistos se incrementó hasta un 30% en el control DO-GC y un 25% en los ovocitos vitrificados. Por otra parte, debido a que la aplicación de la técnica de PICSI no se ha reportado en ovocitos vitrificados de la especie porcina, los resultados obtenidos en el grupo control COCs fueron similares a los reportados previamente (22% vs 23.8%) (Sánchez-Osorio et al., 2008) por otras TRA. Es importante resaltar que en otros estudios con la finalidad de incrementar las tasas de DE, éstos añaden 10% de suero fetal bovino o de fluido folicular porcino en los medios de cultivo (Park et al., 2005; Somfai et al., 2014). Sin embargo, en el presente estudio, se obtuvieron resultados similares sin usar estas sustancias, debido a que pueden contener patógenos como virus y ser transmitidos.

Fue importante no solo evaluar los porcentajes de blastocistos obtenidos, también es necesario evaluar la viabilidad y la calidad de los blastocistos. Los resultados mostraron que es posible tener un 100% de blastocistos vivos al día 7 por el método de PICSI, sin embargo, la viabilidad de los blastocistos disminuyó en los métodos de FIV e ICSI.

Respecto al número de núcleos, con la técnica de PICSI se obtuvo un mayor número (50-59 células/blastocisto), en comparación con la FIV e ICSI. Por lo que, estos resultados no coinciden con los previamente reportados en los que se obtuvieron embriones con únicamente de 32-40 células/blastocisto (Wu et al., 2017).

Con todas las evaluaciones realizadas, se demuestra que la selección espermática tiene un impacto en la producción embrionaria al asegurar que se inyecte a un espermatozoide que ha completado su maduración y que es capaz de reconocer y adherirse al AH. Es por esto que una mejor calidad de blastocistos pudo obtenerse después de la selección espermática con AH en comparación con la PVP, debido a que con ésta se reduce significativamente el potencial de desarrollo de los embriones.

Debido a que se obtuvo un porcentaje de 25-30% de blastocistos producidos a partir de ovocitos vitrificados, se procedió a la TE para la obtención de crías vivas. Sin embargo, desde la inducción hormonal se obtuvieron resultados diferentes a los esperados. La superovulación como forma de inducción no fue la más adecuada y sólo una de las dos cerdas respondió al tratamiento. Sin embargo, desconocemos si las concentraciones de progesterona en el momento de la TE fueron las óptimas, lo cual pudo haber afectado la implantación de los embriones transferidos. A los casi dos meses de gestación se realizó una ultrasonografía y se identificaron vesículas embrionarias, lo que sugería la implantación de al menos tres embriones, sin embargo, no se obtuvieron crías. En los protocolos de TE en cerdas se ha reportado que el procedimiento quirúrgico induce altos niveles de estrés y menores tasas de implantación en comparación con procedimientos no quirúrgicos (Cameron et al., 2006). Esto se ha atribuido a que, debido a la constitución y alta cantidad de lípidos en el cerdo, los procedimientos de anestesia pueden ser difíciles

de lograr. En este trabajo se realizó la vía quirúrgica sin tener una afección en la cerda durante la cirugía. Por otra parte, se ha reportado y discutido ampliamente si la transferencia de embriones de dos o tres días es mejor que transferirlos en estado de mórula o blastocisto (Stokes et al., 2005). A pesar de esto, se han reportado altas tasas de implantación y nacimientos en embriones procedentes de ovocitos frescos en porcinos en estado de mórula o blastocisto, sin presentar una disminución significativa (Stokes et al., 2005). Por esta razón, en este trabajo se decidió transferir en los estados embrionarios tardíos.

Para el día 35 de gestación en cerdos es posible visualizar al embrión situado en uno de los márgenes de la vesícula y hasta los 38 días la presencia fetal. Sin embargo, en este estudio no se lograron obtener imágenes fetales. Se obtuvieron imágenes correspondientes a una cerda vacía posiblemente debido a que hubo reabsorción embrionaria. Otra posible consideración es que en cerdas, la reabsorción puede deberse a un proceso normal de eliminación de genotipos no aptos para la supervivencia de la cría. Posiblemente al haberse transferido embriones obtenidos de ovocitos vitrificados, aunque en apariencia conservaron su viabilidad, otras estructuras pudieron dañarse, afectando el desarrollo fetal. En cerdos también se ha mencionado que entre un 20 y 40% de los embriones mueren de manera normal en la etapa de pre-implantación debido a características fisiológicas específicas de la especie. Las cerdas ovulan aproximadamente 30 ovocitos los cuales pueden ser fecundados pero, al final, únicamente se tendrán 12 crías vivas, reabsorbiéndose los embriones restantes. A pesar de que no se obtuvieron crías, fue posible registrar 3 datos de implantaciones, lo cual hasta el momento no se ha reportado empleando el método de PCSI en ovocitos criopreservados. Como perspectiva

a este trabajo se sugiere continuar con la producción *in vitro* de blastocistos y TE para lograr la obtención de crías vivas

En resumen, los resultados confirman que, a pesar de que la vitrificación afecta la viabilidad y la MIV, es posible lograr la fertilización, el potencial de desarrollo y la formación de blastocistos con buenos porcentajes de éxito. Esto demuestra que la vitrificación tiene un fuerte impacto en el proceso de MIV. Los ovocitos vitrificados que alcanzan la etapa de MII son capaces de llevar a cabo la maduración citoplásmica y el subsecuente DE (Casillas et al., 2015). Sin embargo, para los eventos posteriores como la FIV y DE, la selección espermática juega un papel muy importante. La contribución del espermatozoide en la embriogénesis se divide en dos periodos: temprano (fertilización hasta < 8-células) y el tardío (8-células hasta el nacimiento). En el periodo temprano, una inadecuada selección espermática puede afectar significativamente la fertilización, la singamia y la división mitótica inicial (Burrell et al., 2014; Neri et al., 2014). En el periodo tardío, el espermatozoide puede afectar la embriogénesis vía genómica. Si el genoma es alterado por fragmentación del ADN se pueden producir bajos porcentajes de blastocistos, bajas tasas de implantación e incluso aborto temprano. En estudios en humanos, en los que se ha llevado a cabo el método de PICSI, se reporta que los espermatozoides que se adhieren al AH incrementan la producción de embriones (Parmegiani et al., 2010). Asimismo, se han reportado disminución de abortos prematuros y altas tasas de embarazo, mayor integridad en el ADN y aumento en las tasas de blastocistos (Yagci et al., 2010). Por lo tanto, la selección espermática con AH sí mejora significativamente las tasas de blastocistos producidos *in vitro*, tanto en el control, como en el grupo de ovocitos vitrificados.

12. CONCLUSIONES

El sistema de co-cultivo con células de la granulosa durante la MIV en ovocitos inmaduros vitrificados y en el control DO-GC permitió obtener ovocitos maduros. Las tasas de fertilización y desarrollo de blastocistos en los ovocitos que fueron madurados en co-cultivo fueron mayores que cuando sólo se pusieron a madurar ovocitos desnudos. Para la fertilización, la exposición espermática al AH antes de la inyección intracitoplasmática permitió seleccionar espermatozoides reaccionados vivos, mejorándose las tasas de FIV y DE. Por lo que, el AH puede ser considerado un mejor método de selección espermática antes de la inyección intracitoplasmática, reemplazando el uso de la PVP para producir blastocistos de ovocitos inmaduros vitrificados. El método de fertilización con PICSÍ fue más eficiente en la producción de blastocistos a partir de ovocitos vitrificados en comparación con la FIV y la ICSI. Sin embargo, la transferencia de embriones producidos *in vitro* por el método de PICSÍ en ovocitos vitrificados, únicamente permitió registrar implantaciones de al menos 3 blastocistos. Hasta el momento no se ha reportado el nacimiento de crías vivas empleando este método.

13. REFERENCIAS

- AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone Y, Goldfarb J. (2010). Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic Review and meta analysis. *Reprod Biomed Online*. 20: 209–222.
- Aflatoonian A, Mansoori-Monghaddan F, Masahajekly M, Mohamadian F. (2010). Comparison of early pregnancy and neonatal outcomes after frozen and fresh embryo transfer in ART cycles. *J Assist Reprod Genet*. 27: 695–700.
- Agca, Y. Liu, J. Peter, AT. Crister, ES. Crister, JK. (1998). Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol Reprod Dev*. 49: 408-415.
- Al-Azawi T, Tavukcuoglu S, Khaki AA, Al-Hasani S. (2013). Cryopreservation of human oocytes, zygotes, embryos and blastocysts: A comparison study between slow freezing and ultra rapid (vitrification) methods. *Middle East Fertil Society J*. 18: 223–232.
- Al-Hasani S, Osmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrich K, Schultze-Mosgau A. (2007). Three years of routine vitrification of human zygotes. Is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reprod Biomed Online*. 14: 288–293.
- Amano T, Mori T, Matsumoto K, Iritani A, Watanabe T. (2005). Role of cumulus cells during maturation of porcine oocytes in the rise in intracellular ca²⁺ induced by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Theriogenology*. 64:261-274.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. (2007). Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Onl*. 14:72-79.
- Aono N, Abe Y, Hara K, Sasada H, Sato E, Yoshida H. (2005). Production of live offspring from mouse germinal vesicle-stage oocytes vitrified by a modified stepwise method, SWEID. *Fertil Steril*. 84:1078-1082.
- Appeltant R, Beek J, Vandenbergh L, Maes D, Soom AV. (2015). Increasing the cAMP concentration during in vitro maturation of pig oocytes improves cumulus maturation and subsequent fertilization in vitro. *Theriogenology*. 83:344–352.
- Appeltant R, Somfai T, Kikuchi K, Maes D, Van Soom A. (2016). Influence of co-culture with denuded oocytes during in vitro maturation on fertilization and developmental competence of cumulus-enclosed porcine oocytes in a defined system. *Anim Sci J*. 87:503-510.

- Arav A, Zeron Y. (1997). Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology*. 47: 341.
- Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, et al. (2008). A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod*. 23: 1976–1982.
- Bavister B. (2004). The role of animal studies in supporting human assisted reproductive technology. *Reprod Fertil Dev*. 16:719-728.
- Best BP. (2015). Cryoprotectant toxicity: facts, issues and questions. *Rejuvenation Res*. 18:422-436.
- Betancourt, M. Bonilla, E. Casas, E. Ducolomb, Y. (2003). Maduración de gametos y fertilización en mamíferos. En *Biología Celular y Molecular*. Jiménez, F. Merchant, H. (eds) Prentice Hall. México. 683-702.
- Black JL, Erickson BH. (1968). Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat Rec*. 161: 45-55.
- Brambillasca F, Guglielmo MC, Coticchio G, Renzini MM, Del Canto M, Fadini R. (2013). The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. *J Assist Reprod Genet*. 30: 1531–1539.
- Brezina PR, Ning N, Mitchell E, Zacur HA, Baramki TA, Zhao Y. (2012). Recent Advances in Assisted Reproductive Technology. *Curr Obstet Gynecol Rep*. 1:166-173.
- Burrell V, Klooster K, Barker CM, Pera RR, Mayers S. (2014). Abnormal Early Cleavage Events Predict Early Embryo Demise: Sperm Oxidative Stress and Early Abnormal Cleavage. *Sci Rep*. 4:6598.
- Byeong-Gyun J. Jin-Soo M, Kwang-Cheul K, Hyo-Jong L, Sang-Yong C, Gyu-Jin RHO. (2001). Follicular fluid enhances sperm attraction and its motility in human. *Andrology*. *J Assist Reprod Genet*. 18: 407-412.
- Cameron RD, Beebe LF, Blackshaw AW. (2006). Cryopreservation and transfer of pig embryos. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 62: 277-291.
- Canesin HS, Brom-de-Luna JG, Choi YH, Pereira AM, Macedo GG, Hinrichs K. (2018). Vitrification of germinal-vesicle stage equine oocytes: Effect of cryoprotectant exposure time on in-vitro embryo production. *Cryobiology*. 81: 185-191.

- Cao Z, Sui L, Li Y, Ji S, Zhang X, Zhang Y. (2012). Effects of chemically defined medium on early development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and cloning. *Zygote*. 20:229-236.
- Casas, E. Betancourt, M. Bonilla, E. Ducolomb, Y. Zayas, H. Trejo, R. (1999). Changes in cyclin B localization during pig oocyte in vitro maturation. *Zygote*. 7: 21-26.
- Casillas F, Ducolomb Y, Lemus AE, Cuello C, Betancourt M. (2015). Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell co-culture system. *Cryobiology*. 71: 299– 305.
- Casillas F, Retana-Márquez S, Ducolomb Y, Betancourt M. (2015b). New Trends in Assisted Reproduction Techniques: Cryopreservation, In vitro Fertilization, Intracytoplasmic Sperm Injection and Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection. *Anat Physiol*. 5: 184. doi: 10.4172/2161-0940.1000184
- Casillas F, Teteltitla-Silvestre M, Ducolomb Y, Lemus AE, Salazar Z, Betancourt M. (2014). Coculture with granulosa cells improve the in vitro maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with cryolock. *Cryobiology*. 69: 299–304.
- Catt, WJ. Rhodes, SL. (1995). Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fertil Dev*. 7: 161-167.
- Chang MC. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 168:697-698.
- Chen C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1: 884-886.
- Choe SA, Tae JC, Shin MY, Kim HJ, Kim HC, Lee JY, et al. (2012). Application of sperm selection using hyaluronic acid binding in intracytoplasmic sperm injection cycles: A sibling oocyte study. *J Korean Med Sci*. 27:1569-1573.
- Cobo A, Castello D, Weiss B, Vivier C, De la Macorra A, Kramp F. (2011). Highest liquid nitrogen quality for vitrification process: Micro bacteriological filtration of LN2. Presented at: 16th World Congress on In Vitro Fertilization. Abstract P052: 289.
- Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB. (1985). Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In vitro Fert Embryo Transf*. 2: 59–64.
- Comizzoli P, Songsasen N, Wildt DE. (2010). Protecting and extending fertility for females of wild and endangered mammals. *Cancer Treat Res*. 156: 87–100.
- Cooper A, Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW. (1998). Differential effects of cryopreservation on nuclear or cytoplasmic maturation in vitro in immature mouse oocytes from stimulated ovaries. *Hum Reprod*. 13 :971–978.

- Coticchio, G. Rossi, G. Borini, A. Grondahl, C. Macchiarelli, G. Flamigni, C. Fleming, S. Cecconi, S. (2004) Mouse Oocyte meiotic resumption and polar body extrusión in vitro are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. *Hum Rep.* 12: 2913-2918.
- Coy P, Cánovas S. (2008). Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusion de gametos. *Revista Inv Clínica.* 60: 403-413.
- Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliviera C, et al. (2004). Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod.* 19: 300–305.
- Criado E, Albani E, Novara PV, Smeraldi A, Cesana A, Parini V, et al. (2010). Human oocyte ultravitrification with a low concentration of cryoprotectants by ultrafast cooling: a new protocol. *Fertil Steril.* 95: 1101–1103.
- Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J, et al. (2004). Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology.* 62: 353–361.
- Cuello C, Sanchez-Osorio J, Alminana C, Gil MA, Parrilla I, Roca J, et al. (2010). Superfine open pulled straws vitrification of porcine blastocysts does not require pretreatment with cytochalasin B and/or centrifugation. *Reprod Fertil Dev.* 22. 808–817.
- De Kruif A. (2003). Fertility and sterility in domestic animals. *Verh K Acad Geneeskld Belg.* 65: 189–202.
- Domínguez A, Salazar Z, Arenas E, Betancourt M, Ducolomb Y, González-Márquez H, Casas E, Teteltitla M, Bonilla E. (2016). Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intracellular communication of porcine oocytes in vitro. *Toxicol in vitro.* 35: 93-99.
- Ducolomb, Y. Romo, S. Balcázar, J.A. Rodarte, L.F. Casas, E. Fragoso, G. Scuitto, E. Betancourt, M. (2005). Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos in vitro. *Téc Pecu Méx.* 43: 425-432.
- Edgar DH, Gook DA. (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod.* 0: 1–19.
- Espinosa-Cervantes R, Córdova-Izquierdo A. (2013). Sexing sperm of domestic animals. *Trop Anim Health Prod.* 45:1-8.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology.* 21: 407–426.

-
- Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. (2004). Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*. 48: 22–35.
 - Fasano, G. Demeestere, I. Englert, Y. (2012). In-vitro maturation of human oocytes: before or after vitrification? *J Assist Reprod Genet*. 29: 507-512.
 - Fernández-Reyes, F. Ducolomb, Y. Romo, S. Casas, E. Salazar, Z. Betancourt, M. (2012). Viability, maturation and embryo development in vitro of vitrified immature and porcine oocytes. *Cryobiology*. 64: 261-266.
 - Flaherty, SP. Payne, D. Swann, NJ. Matthews, CD. (1995). Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 10: 2623-2629.
 - Fujihira T, Kishida R, Fukui Y. (2004). Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI, effects of cytochalasin B and cryoprotectants. *Cryobiology*. 49:286–290.
 - Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ, Downey BR. (1992). In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*. 29: 485–492.
 - García-Roselló E, Coy P, García-Vázquez FA, Ruiz S, Matás C. (2006). Analysis of different factors influencing the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) yield in pigs. *Theriogenology*. 66:1857-1865.
 - Gardner, D. Weissman, A. Howles, C. Shoham, Z. (2012). Textbook of assisted reproduction techniques. 4a ed. Vol. 1. Ed. Informa healthcare. USA, FL.
 - Garrieta, E. Spinaci, M. Bucci, D. Tamanini, C. Galeati, G. (2013). Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 1: 1-17.
 - Ge, L. Sui, HS. Lan, GC. Liu, N. Wang, JZ. Tan, JH. (2008). Coculture with cumulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cumulus oophorus: observations of nuclear and cytoplasmic events. *Fertil Steril*. 90: 2376-2388.
 - Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. (2005). The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod*. 20: 3385–3389.
 - Goto, K. Kinoshita, A. Takuma, Y. Ogawa, K. (1990). Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet Res*. 139: 494-495.
 - Gurtovenko AA, Anwar J. (2007). Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J Phys Chem*. 111:10453-10460.
 - Gutiérrez K, Dicks N, Glanzner WG, Agellon LB, Bordignon V. (2015). Efficacy of the porcine species in biomedical research. *Front in genet*. 6: 293.

- Gutiérrez-Ruíz EJ, Aranda-Cirerol FJ, Rodríguez-Vivas RI, Bolio-González ME, Ramírez-González S, Estrella-Tec J. (2012). Factores sociales de la crianza de animals de traspatio en Yucatán, México. *Bioagrobiencias, sistemas de producción*. 5: 20-28.
- Gómez, M. Catt, J. Evans, G. Maxwell, M. (1997). Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Rep Fertil Dev*. 10: 197-205.
- Gómez, M. Catt, J. Evans, G. Maxwell, M. (1998). Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *Theriogenology*. 49: 1143-1154.
- Henkel R. (2012). Sperm preparation: state-of-the-art-physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Andro*. 14: 260-269.
- Hernández-Pichardo JE, Ducolomb Y, Romo S, Kjelland ME, Fierro R, Casillas F, et al. (2016). Pronuclear formation by ICSI using chemically activated ovine oocytes and zona pellucida bound sperm. *J Anim Sci Biotech*. 7:65.
- Hewitson, L. Simerly, C. Dominko, T. Schatten, G. (2000). Cellular and molecular events after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 53: 95104.
- Hiramoto, Y. (1962). Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp Cell Res*. 27: 416-426.
- Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. (2004). Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod*. 19: 2884–2888.
- Hochi, S. Akiyama, M. Minagawa, G. Kimura, K. Hanada, A. (2001). Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro-matured bovine oocytes. *Cryobiology*. 42: 69-73.
- Hovart G, Seidel GE Jr. (2006). Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-B-cyclodextrin. *Theriogenology*. 66: 1026–1033.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayil C, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. (2003). Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*. 79:1616-1624.
- Huszar G. (2011). Hyaluronic acid binding-mediated sperm selection for ICSI. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (eds.) *Textbook of assisted reproductive techniques*. London. 122-134.
- Imesch, P. Scheiner, D. Xie, M. (2013). Developmental potential of human oocytes matured in vitro followed by vitrification and activation. *J Ovar Res*. 6: 1-5.

- Isachenko EF, Nayudu PL. (1999). Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromatin and spindle normality and cumulus integrity. *Hum Reprod.* 14: 400–408.
- Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch J. (2001). The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryoletters.* 22: 157–162.
- Jain JK, Paulson RJ. (2006). Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril.* 86: 1037–1046.
- Javed A, Mozafari F, Ashwini LS, Ganguly D. (2015). Commentary: Physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI), an alternative to the standard ICSI procedure. *MOJ Anat Physiol.* doi:10.15406/mojap.2015.01.00009.
- Katkov II. (2012). *Current frontiers in cryobiology.* Intech web.org. Rijeka, Croatia.
- Kato Y, Nagao Y. (2012). Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reprod Med Biol.* 11:165-176.
- Kim TJ, Hong SW. (2011). Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation. *J Assist Reprod Genet.* 28:73-76.
- Kobayashi E, Hishikawa S, Teratani T, Lefor AT. (2012). The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplant Res.* 1:8.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. (1999). Birth following vitrification of small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod.* 14: 30773079.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.* 1: 608–614.
- Kuwayama M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos. The Cryotop method. *Theriogenology.* 67: 73–80.
- Lane M, Bavister B, Lyons E, Forest K. (1999). Container-less vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol.* 17: 1234–1236.
- Lassalle B, Testart J, Renard JP. (1985). Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril.* 44: 645–651.
- Lee DR, Yang YH, Eum JH, Seo JS, Ko JJ, Chung HM, et al. (2007). Effect of using slush nitrogen (SN2) on development of microsurgically manipulated vitrified/warmed mouse embryos. *Hum Reprod.* 29: 2509–2514.

- Lee HJ, Elmoazzen H, Wright D, Biggers J, Rueda BR, Heo YS, et al. (2010). Ultra-rapid vitrification of mouse oocytes in low cryoprotectant concentrations. *Reprod Biomed Online*. 20: 201–208.
- Lemus-Flores C, Ulloa-Arvizu R, Ramos-Kuri M, Estrada FJ, Alonso RA. (2001). Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. *J Anim Sci*. 79: 3021–3026.
- Li R, Lai L, Wax D, Hao Y, Murphy CN, Rieke A, et al. (2006). Cloned transgenic swine via in vitro production and cryopreservation. *Biol Reprod*. 75: 226–230.
- Li, X. Hamano, K. Qian, XQ. Funachi, K. Furudate, M. Minato, Y. (1999). Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*. 7: 233-237.
- Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod*. 67: 1671– 1680.
- Loi, P. Ledda, S. Filka, J. Cappai, P. Moor, RM. (1998) Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effects of activation protocols. *Biol Reprod*. 58: 1177-1187.
- Lorenzen E, Follmann F, Jungersen G, Agerholm JS. (2015). A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection. *Vet Res*. 46: 116.
- Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL. (2002). Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology*. 58: 911–919.
- Mahmoud KG, Scholkamy TH, Ahmed YF, Seidel GE Jr, Nawito MF. (2010). Effect of different combinations of cryoprotectants on in vitro maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. *Reprod Dom Anim*. 45: 565–571.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod*. 54: 1059–1069.
- Mavrides A, Morroll D. (2005). Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *Europ J Obstet, Gyneco, and Reprod Biol*. 118: 66–70.
- Mazur P, Leibo SP, Seidel GE Jr. (2008). Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod*. 78: 2–12.
- Mazur P. (2004). Principles of cryobiology. In fuller B, lane N, benson E, eds. *Life in the frozen state*. Boca raton, FL. CRC Press, pp. 3-65.

-
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. (2000). Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil.* 118: 163–170.
 - Men H, Monson RL, Rutledge JJ. (2002). Effect of meiotic stage and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology.* 57: 1095–1103.
 - Min-Hee K, Joydeep D, Sangiliyandi G, Hwan-Woo P, Hyuk S, Chankyu P, et al. (2017). The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: a mechanistic study. *Theranostics.* 7:4735-4752.
 - Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. (1998). Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 13: 2874–2879.
 - Mullen SF, Fahy GM. (2012). A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs, and sheep. *Theriogenology.* 78: 1709-1719.
 - Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB. (1994). Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod.* 51: 618–622.
 - Neri QV, Lee B, Rosenwaks Z, Machaca K, Palermo GD. (2014). Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) *Cell Cal.* 55:24-37.
 - Norris RP, Freudzon M, Nikolaev VO, Jaffe LA. (2010). EGF receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to luteinizing hormone. *Reproduction.* 140:655-662.
 - Núñez R, Caballero P. (2014). Interacciones espermatozoide-cúmulo. 189-207. doi: 10.13140/2.1.4339.9685.
 - Ogawa B, Ueno S, Nakayama N, Matsunari H, Nakano K, Fujiwara T, et al. (2010). Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification. *J Reprod Dev.* 56: 356–361.
 - Palma GA, Argañaraz ME, Barrera AD, Rodler D, Mutto AA, Sinowatz F. (2012). Biology and biotechnology of follicle development. *The Sci World J.* doi:10.1100/2012/938138.
 - Park CY, Uhm SJ, Song SJ, Kim KS, Hong SB, Chung KS, et al. (2005). Increase of ICSI efficiency with hyaluronic acid binding sperm for low aneuploidy frequency in pig. *Theriogenology.* 64:1158-1169.
 - Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. (2010). Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril.* 4: 1525–1528.
-

-
- Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. (2010b). Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet.* 27:13-16.
 - Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 12: 532–541.
 - Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. (1997). Birth of healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril.* 68: 724–726.
 - Pyror JH, looney CR, Romo S, Kraemer DC, Long CR. (2011). Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. *Theriogenology.* 75: 24–33.
 - Rall WF, Fahy GM. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature.* 313: 573–575.
 - Rojas C, Palomo JM, Albarracin JL, Mogas T. (2004) Vitrification of immature pig oocytes: Study of distribution of chromosomes, microtubules and actin microfilaments. *Cryobiology.* 49: 211-220.
 - Romar R, Coy P, Rath D. (2012). Maturation conditions and boar affect timing of cortical reaction in porcine oocytes. *Theriogenology.* 78:1126–1139.
 - Sales AD, Lobo CH, Carvalho AA, Moura AA, Rodrugues APR. (2013). Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Genet Mol Res.* 12: 6718–6732.
 - Salustri A, Yanagishita M, Underhill AB, Laurent TC, Hascall VC. (1992). Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol.* 151:541-551.
 - Santiquet N, Robert C, Richard FJ. (2013). The dynamics of connexin expression, degradation and localization are regulated by gonadotropins during the early stages of in vitro maturation of swine oocytes. *PLoS One.* 4: doi: 10.1371/journal.pone.0068456.
 - Santos RM, Barreta MH, Frajblat M, Cucco DC, Mezzalira JC, Bunn S, et al. (2006). Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. *Ciencia Rural.* 36: 1501–1506.
 - Saragusty J, Arav A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and cryopreservation. *Reproduction.* 141: 1–19.

- Sasseville M, Gagnon MC, Guillemette C, Sullivan R, Gilchrist RB, Richard FJ. (2009). Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Mol Endocrinol.* 23: 700-710.
- Senbon S, Hirao Y, Miyano T. (2003). Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev.* 49: 259-269.
- Shirazi A, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B, Shams-Esfandabadi N. (2009). Effect of culture system on survival rate of vitrified bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology.* 59:285-290.
- Shirazi, A. Ostad-Hosseini, E. Ahmadi, E. Heidari, B. Shams-Esfandabadi, N. (2009). In vitro development competence of ICSI-derived activated ovine embryos. *Theriogenology.* 71: 342-348.
- Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, et al. (2010). Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril.* 94: 2088–2095.
- Sohl G, Willecke K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cadiovasc Res.* 1:228-232.
- Somfai T, Kikuchi K, Nagai T. (2012). Factors affecting cryopreservation of porcine oocytes. *J Reprod Dev.* 58: 17–24.
- Somfai T, Men NT, Noguchi J, Kaneko H, Kashiwazaki N, Kikuchi K. (2015). Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens. *J Reprod Dev.* 61:571-579.
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Nakai M, Maedomari N, et al. (2009). Live piglets derived from in vitro-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol Reprod.* 80: 42–49.
- Somfai T, Yoshioka K, Tanihara F, Kaneko H, Noguchi J, Kashiwazaki N, et al. (2014). Generation of live piglets from cryopreserved oocytes for the first time using a defined system for in vitro embryo production. *PLoS One.* 9: e97731.
- Somfai, T. Noguchi, J. Kaneko, H. Nakai, M. Ozawa, M. Kashiwazaki, N. Egerszegi, I. Ratky, J. Nagai, T. Kikuchi, K. (2010) Production of good-quality porcine blastocysts by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *Theriogenology.* 73: 147-156.

- Stokes PJ, Abeydeera LR, Leese HJ. (2005). Development of porcine embryos in vivo and in vitro; evidence for embryo cross talk in vitro. *Dev Biol.* 284: 62-71.
- Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG. (2009). Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim.* 44: 50-58.
- Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodríguez-Martínez H. (2000). Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *Int J Androl.* 23:13-21.
- Swindle MM, Makin A, Herron Aj, Clubb FJ, Frazier KS. (2012). Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol.* 49:344-356.
- Sánchez F, Smítz J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Bioch Biop Acta.* 1822: 1896-1912
- Sánchez-Osorio J, Cuello C, Gil MA, Almiñana C, Parrilla I, Caballero I, et al. (2008). Factors affecting the success rate of porcine embryo vitrification by the open pulled straw method. *Anim Reprod Sci.* 108:334–344.
- Sánchez-Osorio, J. Cuello, C. Gil, A. Parrilla, I. Maside, C. Albiñana, C. Lucas, X. Roca, J. Vázquez, JM. Martínez, EA. (2010). Vitrification and warming of in vivo-derived porcine embryos in a chemically defined medium. *Theriogenology.* 73: 300-308.
- Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. (2000). Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod.* 63:805-810.
- Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. (2004). Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod.* 70: 548-556.
- Tong XH, Wu LM, Jin RT, Luo LH, Luan HB, Liu YS. (2012). Fertilization rates are improved after IVF if the corona radiata is left intact in vitrified-warmed human oocytes. *Hum. Reprod.* 22: 3208-3214.
- Uehara, T. Yanagimachi, R. (1976). Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod.* 15: 467-470.
- Ulbrich SE, Schoenfelder M, Thoene S, Einspanier R. (2004). Hyaluronan in the bovine oviduct-modulation of synthases and receptors during the estrous cycle. *Mol Cell Endocrinol.* 214: 9-18.

- Vajta G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Rep Sci.* 60: 357-364.
- Valojerdi MR, Eftekhardi-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. (2009). Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet.* 26: 347–354.
- Verma OP, Kumar R, Kumar A, Chand S. (2012). Assisted reproductive techniques in farm animal – from artificial Insemination to nanobiotechnology. *Vet World.* 5:301-310.
- Vieira AD, Mezzalira A, Barieri DP, Lehmkuhi RC, Rubin MI, Vajta G. (2002). Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology.* 45: 91–94.
- Vite JA, Ortiz DA, Hernández I, Tovar JM, Ayala AR. (2005). Análisis epidemiológico de la infertilidad en una población mexicana. *Ginecol Obstet Mex.* 73: 360–364.
- Wei Y, Fan J, Li L, Liu Z, Li K. (2016). Pretreating porcine sperm with lipase enhances developmental competence of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Zygote.* 4:594-602.
- Wennerholm UB, Albertsson-Wikland K, Bergh C, Hamberger L, Niklasson A, Nilsson L, et al. (1998). Postnatal growth and health in children born after cryopreservation as embryos. *Lancet.* 351: 1085–1090.
- Whittingham DG. (1971). Survival of mouse and embryos after freezing and thawing. *Nature.* 233: 125–126.
- Wilder BT, Betancourt JL, Epps CW, Crowhurst RS, Mead JI, Ezcurra E. (2014). Local extinction and unintentional rewilding of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) on a desert island. *PLoS One.* 9: e91358.
- Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xiao-Lu BX, et al. (2006). Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol Rep Dev.* 73:1454-1462.
- Wu G, Jia B, Quan G, Xiang D, Zhang B, Shao Q, Hong Q. (2017). Vitrification of porcine immature oocytes: Association of equilibration manners with warming procedures, and permeating cryoprotectants effects under two temperatures. *Cryobiology.* 75:21-27.
- Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. (2010). Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: An acridine orange fluorescence study. *J Androl.* 31:566-572.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction.* 2nd edn. New York; Raven Press Ltd; pp. 189-317.

-
- Yavin S, Arroyo A, Roth Z, Arav A. (2009). Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum Reprod.* 24: 797–804.
 - Zeilmaker GH, Alberda AT, VanGent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. (1984). Two pregnancies following transfer of intact frozen–thawed embryos. *Fertil Steril.* 42: 293–296.
 - Zhang M, Ouyang H, Xia G. (2009). The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Rep.* 7:399-409.
 - Zhang X, Miao Y, Zhao J, Spate L, Bennett M, Murphy C, Schatten H, Prather R. (2010). Porcine oocytes denuded before maturation can develop to the blastocyst stage if provided a cumulus cell-derived co-culture system. *J Anim Sci.* 88: 2604-2610.
 - Zhou GB, Li N. (2009). Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. *Mol Hum Reprod.* 15:279-285.
 - Zhou XL, Naib AA, Sun DW, Lonergan P. (2010). Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology.* 61: 66-72.

14. ANEXO

14.1 Preparación de medios

- **SOLUCIÓN SALINA:** para transportar ovarios y hacer lavados.

Contiene: NaCl 18.4 g y 1 mL de antibiótico para 2 L de agua destilada.

- **TL-HEPES-PVA:** para lavar los ovocitos después de la punción ovárica.

	1 L	500 mL	250 mL		1 L	500 mL	250 mL
NaCl	6.6633	3.33165	1.665	Sorbitol	2.186	1.093	0.545
KCl	0.2386	0.1193	0.059	NaHCO₃	0.168	0.084	0.042
NaH₂PO₄	0.0408	0.0204	0.0102	Gentamicina	0.0250	0.0125	0.0062
Na Lactate	1.4ml	0.7ml	0.35ml	Penicilina G	0.065	0.0325	0.01625
MgCl₂.6H₂O	0.1017	0.05085	0.025	PVA	0.1	0.050	0.025
HEPES	2.383	1.1915	0.5957	@CaCl₂.2H₂O	0.294	0.147	0.0735
Na-Piruvate	0.022	0.011	0.0055				

® Poner al final

Ajustar pH 7.3-7.4, filtrar y almacenar a 4 °C.

- **TCM-199:** para maduración in vitro.

	100 mL	50 mL
PVA	0.1	0.05
D-Glucosa	0.05496	0.02748
Ac. Pirúvico	0.01	0.005
Estreptomina	5 mg	2.5
Penicilina	7.5 mg	3.75

- **TBM:** para el lavado de ovocitos para antes de la fertilización y medio de fertilización.

	200 mL	100 mL	50 mL
NaCl	1.32	0.6611	0.3305
KCl	0.0448	0.0224	0.0112
CaCl₂.2H₂O	0.2204	0.1102	0.0551
Tris (base libre)	0.4846	0.2423	0.12115
Glucosa	0.3964	0.1982	0.0991
Na-Piruvate	0.11	0.055	0.0275

- **DPBS:** para lavado de espermatozoides.

Tomar 250 mL del DPBS preparado y agregar 0.025 g de CaCl₂ anhidro, agregar 25 mg de penicilina y 18.75 mg de estreptomycin. Antes de usar, tomar 50 ml y agregar 0.05 g de BSA 8022, ajustar pH 7.2-7.3, filtrar y guardar en la incubadora de aceites. De preferencia pH 7.2.

- **NCSU-23:** para el desarrollo embrionario.

Para 100 mL, ajustar pH 7.2-7.3 y filtrar. Suplementar 10 mL con 0.04 g de BSA A-7511, filtrar y preparar cajas.

NaCl	0.6355
KCl	0.0356
KH₂PO₄	0.0162
MgSO₄.7H₂O	0.0293
D-glucosa	0.1
Glutamina	0.0146

Taurina	0.0876
Hipotaurina	0.0546
NaHCO₃	0.2106
CaCl₂.2H₂O	0.025
Penicilina G	0.0075
Estreptomycin	0.005



Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell co-culture system



Fahiel Casillas^{a,b}, Yvonne Ducolomb^a, Ana E. Lemus^c, Cristina Cuello^d, Miguel Betancourt^{a,*}

^aDepartamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 DF, Mexico

^bDoctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 DF, Mexico

^cDepartamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 DF, Mexico

^dDepartamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad de Murcia, Espinardo 30100, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 March 2015

Revised 23 July 2015

Accepted 3 August 2015

Available online 5 August 2015

Keywords:

Vitrification

Immature oocytes

Porcine

IVF

ICSI

Granulosa cells

Embryo development

Cryolock

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the capacity of vitrified-warmed porcine immature oocytes to mature and to be fertilized using in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection, and to determine the subsequent embryo development. Immature oocytes were vitrified using ethylene glycol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants and the Cryolock method. After warming oocytes were cultured 44 h for maturation. Oocytes were randomly distributed in three treatment groups and subjected to in vitro fertilization (Experiment 1) or intracytoplasmic sperm injection (Experiment 2) procedures. The results indicate that the embryo development was higher in denuded oocytes co-cultured with granulosa cells (NkO-CC group) fertilized by in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection compared to cumulus-cell oocyte complexes (COCs group), showing no significant differences with control. Vitrified denuded oocytes matured with a co-culture system NkO-CC group, displayed higher cleavage rate and blastocyst production than vitrified COCs group. Blastocysts were successfully obtained after IVF and ICSI procedures; however, the development to the blastocyst stage was better after IVF. These results show that the vitrification-warming media, the employment of a granulosa cell co-culture system and the Cryolock method during vitrification, increased the nuclear and cytoplasmic maturation of vitrified porcine immature oocytes. Further experiments are required to enhance porcine embryo production after vitrification.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The establishment of oocyte cryopreservation procedures is of great importance in human assisted reproduction techniques, animal production for fertility and genetic improvement, including

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CC, cumulus cells; CPAs, cryoprotectant agents; COCs, cumulus-cell oocyte complexes; ED, embryo development; EG, ethylene glycol; EGF, epidermal growth factor; GV, germinal vesicle stage; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IVF, in vitro fertilization; IVM, in vitro maturation; Me₂SO, dimethylsulphoxide; mTBM, modified Tris-buffered-medium; MTT, thiazolyl blue; NkO-CC, oocytes vitrified without cumulus cells and matured in co-culture with granulosa cells; PB, polar body; PN, pronuclei; PVA, polyvinyl alcohol; PVP, polyvinylpyrrolidone; TCM-199, tissue culture medium 199; V-W medium, vitrification-warming medium; ZP, zona pellucida.

* Corresponding author.

E-mail addresses: fahiel.ca@gmail.com (F. Casillas), duco@xanum.uam.mx (Y. Ducolomb), anaelenalemus@prodigy.net.mx (A.E. Lemus), ccuello@um.es (C. Cuello), bet@xanum.uam.mx (M. Betancourt).

endangered animal species [8,11]. Successful vitrification can be determined by the meiotic stage of the oocyte. The oocyte developmental stage is considered a critical factor for its survival and developmental competence after cryopreservation [40]. In comparison with other mammals, porcine oocytes have shown to be more difficult to cryopreserve in the germinal vesicle stage (GV) [26,32,45]. This fact has been attributed to their high lipid content [34], which decreases in the following developmental stages. Mature oocytes display higher survival rates after vitrification than GV oocytes, but they often show spindle abnormalities, reducing their fertilization and developmental competence [38]. Although GV oocytes have low survival rates, they have the ability to undergo nuclear and cytoplasmic maturation to continue embryo development (ED). In regard in vitro embryo vitrification, blastocysts have been successfully cryopreserved with high survival and re-expansion rates [6,33]. However, in vitro produced blastocysts present higher DNA fragmentation and a lower total

cell number than *in vivo* generated blastocysts [31]. In the present study we highlight that the vitrification of GV oocytes has more advantages for assisted reproduction techniques than other stages.

In a previous study [5] it was demonstrated that vitrified porcine immature oocytes were able to preserve survival up to 90%, and 49% were able to mature *in vitro*. These results were obtained using a co-culture with homologous granulosa cells. It was also reported that granulosa cells in co-culture with the oocytes after vitrification, seem to recognize and surround oocytes improving *in vitro* maturation (IVM). Therefore, maintaining their viability is essential for IVM.

In vitro models are useful tools to understand the effects and mechanisms involved during vitrification. Also the porcine model was chosen because of its reproductive and endocrine systems are very similar to those of humans [10,12].

For assisted reproduction technologies, *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) were developed in order to improve fertilization and ED. The IVF technique was developed in 1940. But it was not until 1978 when Steptoe and Edwards established greater details of the IVF process, resulting in the first human IVF baby born [46]. After this, several studies have shown fertilization and outcome success in different species [9,17,25,27,37,44]. However, in some domestic species its use has currently decreased since it has the disadvantage of not excluding events as polyspermy, which causes aberrant development of the early embryo and difficulty completing gestation [24]. In swine, polyspermy by *in vitro* fertilization occurs in high incidence (50%), whereas *in vivo* is between 30% and 40% [50], reducing the percentages of monospermy and the possibility to obtain live offspring. In 1992, ICSI arose to solve this issue [35]. However, by ICSI, results have not been as expected because procedure failures in the oocyte activation, sperm head decondensation, sperm ejection, and zona pellucida (ZP) rupture have been reported [7,14,23,29,43]. One of the main vitrification problems is the hardening of the ZP and cytoplasmic membrane [49] affecting the sperm-oocyte recognition during IVF. For this reason we hypothesized that the ICSI procedure could solve some of the vitrification problems. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the capacity of vitrified-warmed porcine immature oocytes to mature and to be fertilized using IVF or ICSI and to determine the subsequent ED.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

2.1.1. Experiment 1: embryo development obtained with vitrified immature oocytes after IVM and IVF

Nine replicates were performed to evaluate the ED after IVF. After collection, COCs were randomly allocated in the following treatment groups: (1) non-vitrified fresh oocytes (control group, $n = 373$); (2) COCs vitrified-warmed (COCs group, $n = 288$); (3) COCs denuded before vitrification, vitrified-warmed and matured in the granulosa cell co-culture system. (NkO-CC group, $n = 327$). After IVM matured oocytes derived from each experimental group were subjected to conventional IVF and cultured as described below.

2.1.2. Experiment 2: embryo development obtained with vitrified immature oocytes after IVM and ICSI

Five replicates were performed. After collection, COCs were randomly allocated in the following treatment groups: (1) non-vitrified fresh oocytes (control group, $n = 161$); (2) COCs vitrified-warmed (COCs group, $n = 125$); (3) COCs denuded before

vitrification, vitrified-warmed and matured in the granulosa cell co-culture system (NkO-CC group, $n = 136$). After IVM, matured oocytes derived from each experimental group were subjected to ICSI and cultured as described below.

2.2. Chemicals

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3. Culture conditions

Oocytes maturation, gametes co-incubation and embryos cultured were performed under mineral oil and incubated at 38.5 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air and humidity at saturation.

2.4. Oocyte collection and IVM

Ovaries were obtained from pre-pubertal gilts at a local slaughterhouse ("Los Arcos", Edo. de Mexico) and transported to the laboratory in 0.9% NaCl solution at 25 °C within 2 h after collection. Ovarian follicles between 3 and 6 mm in diameter were aspirated using an 18-gauge needle fixed to a 10 mL disposable syringe to obtain the cumulus-cell oocyte complexes (COCs). Tyrode's modified medium supplemented with 10 mM sodium lactate, 10 mM HEPES and 1 mg/mL polyvinyl alcohol (PVA) (TL-HEPES-PVA) was used for COCs collection and washing [2]. Oocytes with uniform cytoplasm surrounded by a two-layer compact mass of cumulus cells (CC) were selected for culture. Then, COCs were washed three times in 500 µL drops of maturation medium composed of TCM-199 with Earlé's salts and 26.2 mM sodium bicarbonate (in vitro, Mexico City) supplemented with 0.1% PVA, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine and 10 ng/mL EGF. For maturation, groups from 30 to 40 COCs were placed in each well of a four-well dish (Thermo-Scientific Nunc, Rochester NY) containing 500 µL of maturation medium supplemented with 0.5 µg/mL LH and 0.5 µg/mL FSH for 44 h [2].

2.5. Vitrification and warming

The basic medium for vitrification and warming (V-W medium) was TCM-199-HEPES supplemented with 0.5 mM L-glutamine and 0.1% PVA. For vitrification, oocytes were washed twice in V-W medium and sequentially equilibrated in the first vitrification solution containing 7.5% dimethylsulphoxide (Me₂SO) and 7.5% ethylene glycol (EG) for 3 and 1 min in a second vitrification solution containing 16% Me₂SO, 16% EG and 0.4 M sucrose. Groups of six to seven oocytes were placed in a 1.5–2 µL drop of the second solution and loaded into Cryolock (Importadora Mexicana de Materiales para Reproduccion Asistida S. A. de C.V., Mexico City) in less than 1 min; then they were immediately plunged horizontally into liquid nitrogen and stored during 30 min (Cryolock method) [5].

Oocytes were warmed using the one-step method [41]. Briefly, the Cryolock was submerged vertically in a four-well dish containing 800 µL of V-W medium supplemented with 0.4 M sucrose to recover the oocytes. The warmed oocytes were incubated in this medium for 5 min and then recovered and transferred to IVM medium [40,41].

After 44 h of IVM control and vitrified oocytes were assessed by stereomicroscopy. Oocytes displaying signs of degeneration, such as lysed cytoplasmic membrane, were discarded and were not used for IVF procedures.

2.6. Granulosa cells co-culture

For oocyte granulosa cells co-culture, 1×10^6 cells were obtained from immature oocyte denudation and follicular fluid. Co-culture was employed to improve IVM in vitrified immature oocytes [47].

2.7. In vitro fertilization

After IVM, the CC were removed by mechanical denudation in maturation medium containing 0.1% hyaluronidase. Oocytes were washed twice in 500 μ L drops of maturation medium and three times in 500 μ L drops of IVF medium. The medium used for IVF was modified Tris-buffered medium (mTBM) consisting of 13.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, 11 mM glucose and 5 mM sodium pyruvate and supplemented with 0.4% bovine serum albumin (BSA) fraction V and 2.5 mM caffeine [2]. Groups of 30 to 40 denuded oocytes were placed into each well of a four-well dish in 50 μ L size drops covered with mineral oil and incubated for 45 min until insemination.

For insemination, the semen sample was obtained by the gloved hand method at a local swine insemination centre and transported to the laboratory at 16 °C, within 2 h after collection, diluted in Duragen (Magapor, Mexico) 50:50 (v:v). Sperm motility was evaluated, and only samples with a minimum of 80% were selected. Five millilitres of the semen sample were diluted with the same volume of Dulbecco's PBS (DPBS; In Vitro, Mexico City) supplemented with 0.1% BSA fraction V, 75 μ g/mL potassium penicillin G and 50 μ g/mL streptomycin sulphate. This suspension was centrifuged at 61g for 5 min. The supernatant was diluted 1:1 (v:v) with DPBS and centrifuged at 1900g for 5 min. The supernatant was discarded, the sperm pellet diluted with 10 mL of DPBS and centrifuged twice under the same conditions. Finally, the pellet was diluted in 100 μ L of mTBM and the sperm concentration was assessed. After an appropriate dilution in mTBM, 50 μ L of the sperm suspension was added to 50 μ L of the same medium containing oocytes to give a final concentration of 5×10^5 spermatozoa/mL. The gametes were co-incubated in mTBM for 6 h.

2.8. Intracytoplasmic sperm injection

Microinjection was performed using the micromanipulators coupled to an inverted optical differential interference contrast microscope (Nikon eclipse, TE300, Japan). Holding pipettes had an external and internal diameter of 150 and 30 μ m, respectively. Injection pipettes had an outer diameter of 10 μ m and an inner diameter of 8 μ m. Both kinds of pipettes had an angle of 40°.

An oil-covered 35 mm diameter Petri dish (Nunc, Denmark) containing eight drops of 10 μ L mTBM medium for oocytes (3 oocytes/drop) and a drop of 4 μ L of mTBM containing 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) for spermatozoa was prepared. A drop of 1 μ L of the mTBM medium with the same sperm sample used for IVF was added in the extreme of the 4 μ L drop of 10% PVP [19].

For microinjection, only motile sperm with normal morphology were selected and immobilized by hitting the injection needle down its tail. Aspiration of a single sperm was made by the tail into the injection pipette allowing the head to be the last portion to be introduced. Later, both pipettes were moved to the drop containing the oocytes. Mature oocytes were held by a negative pressure of the holding pipette, maintaining the first polar body in the position of the six or twelve o'clock to prevent cell damage. The sperm was carefully expelled from inside the injection needle and reloaded for washing in order to remove the PVP surrounding the sperm before injection. Subsequently, in the position of the three o'clock, the injection pipette was inserted into the oocyte so that the sperm head could be in touch with the cytoplasm in order to facilitate

oocyte activation. A small amount of cytoplasm was aspirated into the injection needle immediately after the sperm was introduced into the oocyte to be sure that the injection took place correctly. The micropipette was removed and the oocyte was released from the holding pipette. Microinjected oocytes were washed twice and incubated in mTBM in the same conditions for oocytes subjected to conventional IVF [18,20].

2.9. Embryo culture

After 6 h of incubation in mTBM, fertilized oocytes were washed three times in 500 μ L drops of culture medium consisting in North Carolina State University 23 development medium (NCSU-23) supplemented with 0.4% BSA to remove sperm [2]. Then 30–40 putative zygotes were transferred to four-well dishes containing 500 μ L drops of culture medium and incubated for 144 h to determine ED.

2.10. Evaluation of IVM and IVF parameters

To assess IVM and IVF parameters, oocytes were stained with 10 μ g/mL bisbenzimidazole (Hoechst 33342) in DPBS for 45 min and evaluated using an epifluorescence microscope (Zeiss Axiostar) at 400 \times magnification [4]. Maturation was evaluated after 44 h, oocytes having a GV or in the metaphase I were considered immature, and those in the metaphase II with the first polar body (PB) as matured [32]. IVF was evaluated 16 h after co-incubation and ICSI after 16 h post injection. Oocytes showing two PB and two pronuclei (PN) were considered fertilized, and those with two PB and one PN were considered as activated (Fig. 1). The percentages of penetration and fertilization efficiency were calculated from the number of oocytes inseminated. The percentage of monospermy was calculated from the number of total penetrated oocytes.

2.11. Evaluation of embryo development

The embryo cleavage development and blastocyst formation were determined at 48 and 144 h respectively, using an inverted microscope (Olympus Optical). Embryos with 2–8 blastomeres were considered early embryos, those with a higher number were classified as morulae, and those with a blastocoele were considered as blastocyst.

2.12. Statistical analysis

In regard to the fertilization parameters three experiments were performed for IVF and ICSI. For ED, nine replicates were performed for IVF and five for ICSI. The data obtained for each indicator (cleavage rate and ED) of vitrified immature oocytes and in co-culture with granulosa cells were treated as non-parametric as well as all the fertilization parameters, then analyzed by a multiple comparison Duncan test using 2008 NCSS (Number Cruncher Statistical Software). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1

Immature oocytes that survived vitrification and warming procedures displayed similar fertilization, monospermy and fertilization efficiency than control oocytes (Table 1).

However, vitrification impaired the subsequent ED. The cleavage rate was higher ($P < 0.05$) in the control than that observed in vitrified groups. The NkO-CC group displayed better ($P < 0.05$)

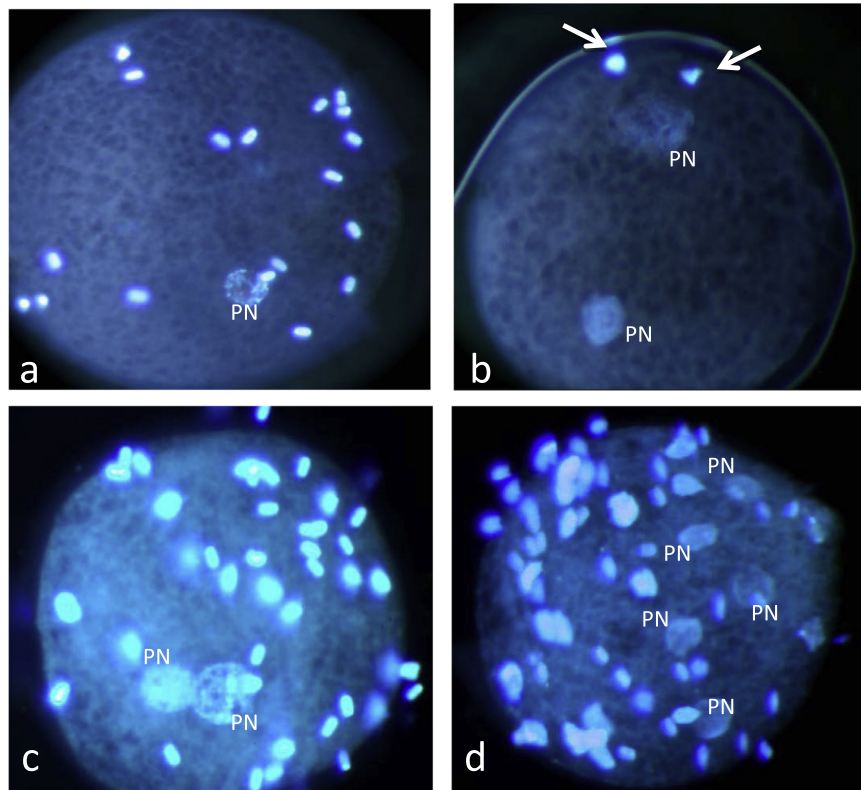


Fig. 1. Fertilization parameters from vitrified immature porcine oocytes after IVF (a, c and d) and ICSI (b). PN: pronucleous; arrows: polar bodies.

Table 1
Fertilization parameters of porcine oocytes during IVF.

Group	Oocyte <i>n</i>	Penetration (%)	Monospermy (%)	Fertilization efficiency (%)
Control	65	42/65 (65) ^a	27/42 (64) ^a	27/65 (42) ^a
Vitrified COCs	30	16/30 (53) ^a	11/16 (69) ^a	11/30 (37) ^a
Vitrified NkO-CC	26	14/26 (54) ^a	10/14 (72) ^a	10/26 (39) ^a

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

COCs: vitrified cumulus-cell oocyte complexes.

NkO-CC: denuded immature oocytes vitrified and co-culture with granulosa cells during IVM.

embryo developmental ability than vitrified COCs. No differences were observed between control and NkO-CC group related to the blastocyst formation rate, which was higher than that achieved in the COCs group (Fig. 2; Table 2).

3.2. Experiment 2

Immature oocytes that survived to vitrification and warming procedures displayed similar fertilization rates than control oocytes (Table 3). The percentage of oocytes with two PB and one PN was higher ($P < 0.05$) in COCs group than control and NkO-CC.

However, vitrification impaired the subsequent ED in COCs group. The cleavage rate was similar in the control and NkO-CC group. The NkO-CC group displayed better embryo developmental ability than vitrified COCs. No differences were observed between control and NkO-CC group related to the blastocyst formation rate, which was higher ($P < 0.05$) than that achieved in the COCs group (Fig. 2; Table 4).

Nevertheless, the development to the blastocyst stage was better after IVF than ICSI (Table 2; Table 4).

4. Discussion

Few reports have tested fertilization and ED rates after vitrification in several mammalian species [1,13,21,30]. Moreover the development of efficient systems for in vitro production of porcine embryos from vitrified GV oocytes still remain low, since a high incidence of vitrification–warming injuries have been reported [13].

At the present time, important advances in porcine GV oocyte cryopreservation have been made. The vitrification of denuded oocytes and the employment of a granulosa cell co-culture during maturation can improve survival and maturation rates [5]. Recently, it was also reported the first successful piglet production from cryopreserved immature oocytes [45]. Despite this, percentages of embryo survival and development are considerably low.

For oocyte vitrification the main factors affecting survival are the nuclear stage of the cell, cryoprotectant concentration, viscosity and volume, device cooling/warming rates and embryologist ability. Immature oocytes have resulted to be more sensitive during vitrification than those matured or embryos. This impact can be due to their high lipid content and low permeability to cryoprotectant agents (CPAs) in comparison with other stages. The use of these chemicals can be detrimental to the cell because they are highly toxic [5]. They can be able to cause changes in the membrane structure, mainly in the lipid bilayer, like hardening and rupture. These alterations could block the oocyte-sperm recognition avoiding the fertilization process. Therefore, the development of efficient vitrification procedures with reduced CPAs concentration and exposure times are required in order to reduce vitrification–warming injuries.

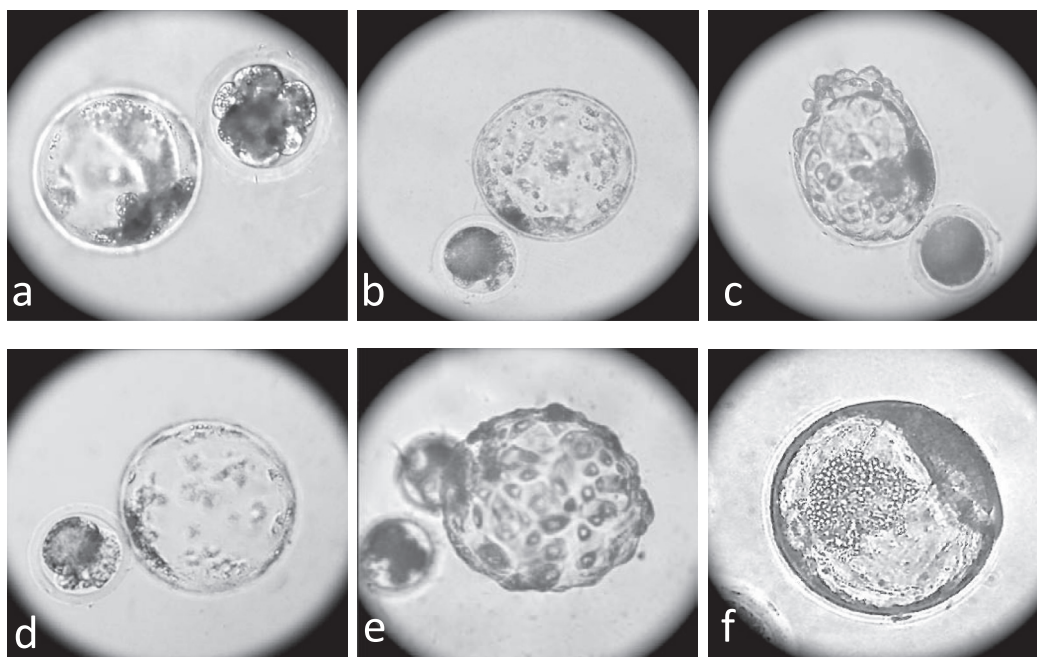


Fig. 2. Blastocysts derived from vitrified immature porcine oocytes after IVF (a–c). Blastocysts derived from vitrified immature porcine oocytes after ICSI (d–f). Images were obtained with an inverted microscope with 400× magnification.

Table 2
ED of porcine vitrified immature oocytes obtained by IVF after 144 h.

Group	GV oocytes <i>n</i>	Cleavage rate (%)	Embryo development (%) Blastocyst
Control	373	272/372 (73) ^a	26/272 (9) ^a
Vitrified COCs	288	159/288 (55) ^b	4/159 (3) ^b
Vitrified NkO-CC	327	202/327 (62) ^c	30/202 (16) ^a

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

COCs: vitrified cumulus-cell oocyte complexes.

NkO-CC: denuded immature oocytes vitrified and co-culture with granulosa cells during IVM.

In the current study, the results obtained of monospermy by IVF were not different from those observed in both treated groups. The percentages of monospermy are higher than those previously reported [3,39]. The possibility to obtain high monospermy rates depends on the sperm concentration used for IVF. In this study, the sperm concentration was lower than that reported by a previous study (2×10^6 spermatozoa/mL) allowing a higher fertilization efficiency [22]. Other important finding is that polyspermy was

Table 3
Fertilization parameters of porcine oocytes during ICSI.

Group	Oocytes <i>n</i>	Oocytes with two PBs and one PN (%)	Oocytes with two PBs and two PN (%)
Control	35	4/35 (11) ^a	14/35 (40) ^a
Vitrified COCs	30	5/30 (17) ^b	10/30 (33) ^a
Vitrified NkO-CC	24	2/24 (8) ^a	9/24 (38) ^a

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

COCs: vitrified cumulus-cell oocyte complexes.

NkO-CC: denuded immature oocytes vitrified and co-culture with granulosa cells during IVM.

decreased in both vitrified treatments. This fact can be due to the hardening of the ZP during the vitrification process associated with the exocytosis of cortical granules, known as a protective mechanism against polyspermy [50].

In terms of penetration and fertilization efficiency, the results obtained in the current study are similar to those reported in fresh oocytes [3], indicating that the IVF procedure allows an adequate ED. This procedure showed higher rates of fertilized oocytes and ED compared to ICSI on vitrified GV oocytes. This fact can be explained because IVF is a more natural insemination procedure; nevertheless, several failures have been reported during the fertilization process. These include: acrosome reaction, ZP penetration, oolema fusion, cortical reaction and possibly oocyte activation. It is well known that the oocyte activation is required during the fertilization process to complete the male pronuclear development. One of the main problems during ICSI is a non-adequate sperm head decondensation and pronuclei formation [16]. In the present study, ICSI results indicate that by this procedure, fertilization and ED success still remains low. This fact has also been reported in other species [7]. Therefore, the acknowledgement of different fertilization procedures is required to improve embryo production.

In regard ED, results performed by IVF indicate that in the NkO-CC group blastocyst formation was no statistically different

Table 4
ED of porcine vitrified immature oocytes obtained by ICSI after 144 h.

Group	GV oocytes <i>n</i>	Cleavage rate (%)	Embryo development (%) Blastocyst
Control	161	100/161 (62) ^a	5/100 (5) ^a
Vitrified COCs	125	70/125 (56) ^b	2/70 (3) ^b
Vitrified NkO-CC	136	94/136 (69) ^a	6/94 (6) ^a

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

COCs: vitrified cumulus-cell oocyte complexes.

NkO-CC: denuded immature oocytes vitrified and co-culture with granulosa cells during IVM.

compared to control. These results overcome the previously reported ones in different species such as swine [11,42] and ovine [13]. The results also demonstrate that the vitrification protocol, the Cryolock method, and the co-culture system are able to enhance not only IVM rates [5], but also IVF without affecting ED. This fact can be mainly due to the presence of CC in co-culture with the oocytes during maturation, allowing them to retain their developmental capacity to improve ED. The use of a CC co-culture provides new insights in the vitrification of porcine GV oocytes. The presence of CC is of great importance to maintain the gap-junction communications between CC and oocytes to acquire developmental competence, and mitochondrial functions during maturation [48]. For GV oocyte cryopreservation it is known that the vitrification of COCs decreases CC and oocyte viability because the presence of CC in immature oocytes inhibits the CPAs intake, contributing to the ice crystal formation and cell damage. In comparison, denuded oocytes with non-vitrified CC displayed higher cryoprotectant permeability than COCs resulting in higher viability and maturation rates after vitrification [5]. In support to this, our results demonstrate that the vitrification of COCs displayed lower ED rates than NkO-CC. Therefore we suggest for GV oocyte vitrification to perform it with denuded oocytes using a granulosa cell co-culture system during maturation. In addition, these results clearly indicate that even if live offspring has been obtained from vitrified immature oocytes [45] the procedure for vitrification and embryo production could be improved by the use of the co-culture system and the Cryolock method in order to increase live offspring.

On the other hand, results performed by ICSI in the control group were 62% cleavage and 5% blastocyst. In comparison with the IVF control, results by ICSI were lower. In the NkO-CC group the cleavage was 69% and 6% blastocyst showing no significant differences compared to control. Other studies performed by ICSI in porcine immature oocytes showed 39–41% of cleavage and blastocyst formation from 1.8% to 14% [15,42]. This indicates that the results obtained in the current study are higher in cleavage rate but not in blastocyst formation. This fact can be due to the non-use of follicular fluid to increase blastocyst formation, and other vitrification conditions as device and exposure times. It is well known that it could contain unknown factors that possibly can be detrimental for maturation [10] and are undesirable for scientific purposes, decreasing experimental reproducibility.

In regard of blastocyst formation, ICSI rates were lower than IVF in all groups. These results agree with a previous study in domestic species in which it was obtained a higher percentage of fertilization by IVF than ICSI [7]. However, this report was conducted in fresh oocytes and few reports are performed in vitrified oocytes. Also other studies indicate that by IVF good-quality embryos can be obtained on time (5–6 days), but by ICSI, blastocyst formation can be delayed until 10 days with less quality [19].

The lower ED-ICSI rates can be mainly due to sperm chromatin decondensation and oocyte activation failures [14,29], sex chromosome abnormalities [23], sperm ejection [43], and oolema rupture with the introduction to the cell of the PVP medium, which is known to be toxic. Also it is known that in humans, mice, hamster, rabbit and ovine [19], mechanical oocyte activation is induced by ICSI, however in cattle and swine this does not occur [28]. Nevertheless, the success of ED by IVF and ICSI depends on several vitrification factors: device high cooling-warming rates, cryoprotectant agents, nuclear stage, meiotic competence of immature oocytes to reach the nuclear and cytoplasmic maturation, and culture conditions to obtain good-quality blastocysts [5]. In this way, the present study was designed to evaluate the efficiency of a vitrification-warming procedure using the Cryolock method as well as the effect of the co-culture of vitrified immature oocytes with

fresh granulosa cells in order to improve ED by IVF and ICSI techniques.

Finally, this study demonstrates that is possible to obtain blastocysts after IVF and ICSI of vitrified-warmed porcine immature oocytes. Although the procedure efficiency is still low, the co-culture system with CC during IVM has demonstrated to improve the developmental capacity of vitrified immature oocytes. Further studies are needed to improve vitrification and fertilization methods in order to increase embryo production [36].

In conclusion, vitrified denuded oocytes matured with a co-culture system NkO-CC group, displayed higher cleavage rate and blastocyst production than vitrified COCs group. Blastocysts were successfully obtained after IVF and ICSI procedures; however, the development to the blastocyst stage was better after IVF. These results show that the vitrification-warming media, the employment of a granulosa cell co-culture system and the Cryolock method during vitrification, increased the nuclear and cytoplasmic maturation of vitrified porcine immature oocytes. Further experiments are required to enhance porcine embryo production after vitrification.

Statement of funding

The main financial support was obtained by the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa and an external financial support by CONACYT.

Conflict of interest

The authors declare there is no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by CONACYT Scholarship (No. 302760) to Fahiel Casillas. The authors thank Ph.D. Socorro Retana-Marquez for helpful suggestions improving the manuscript. M. Sc. Ernesto Hernandez and Biol. Exp. Alma Lopez for technical assistance. We would also like to thank the slaughterhouse “Los Arcos”, Estado de Mexico for the donation of porcine ovaries.

References

- [1] L.R. Abeydeera, B.N. Day, In vitro fertilization of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium, *Theriogenology* 48 (1997) 537–544.
- [2] L.R. Abeydeera, W.H. Wang, R.S. Prather, B.N. Day, Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro, *Biol. Reprod.* 58 (1998) 1316–1320.
- [3] R. Appeltant, J. Beek, L. Vandenberghe, D. Maes, A.V. Soom, Increasing the cAMP concentration during in vitro maturation of pig oocytes improves cumulus maturation and subsequent fertilization in vitro, *Theriogenology* 83 (2015) 344–352.
- [4] E. Casas, E. Bonilla, Y. Ducolomb, M. Betancourt, Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*, *Toxicol. In Vitro* 24 (2010) 224–230.
- [5] F. Casillas, M. Teteltila-Silvestre, Y. Ducolomb, A.E. Lemus, Z. Salazar, E. Casas, M. Betancourt, Co-culture with granulosa cells improve the in vitro maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with cryolock, *Cryobiology* 69 (2014) 299–304.
- [6] M. Castillo-Martin, M. Yeste, R. Morato, T. Mogas, S. Bonet, Cryotolerance of in vitro-produced porcine blastocysts is improved when using glucose instead of pyruvate and lactate during the first 2 days of embryo culture, *Reprod. Fertil. Dev.* 25 (2013) 737–745.
- [7] W.J. Catt, S.L. Rhodes, Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species, *Reprod. Fertil. Dev.* 7 (1995) 161–167.
- [8] C. Cuello, J. Sanchez-Osorio, C. Almiñana, M. Gil, I. Parrilla, J. Roca, M. Vazquez, E. Martínez, H. Martínez, Superfine open pulled straws vitrification of porcine blastocysts does not require pretreatment with cytochalasin B and/or centrifugation, *Reprod. Fertil. Dev.* 28 (2010) 808–817.

- [9] Y. Ducolomb, S. Romo, J.A. Balcazar, L.F. Rodarte, E. Casas, G.C. Fragoso, E.L. Scitutto, M. Betancourt, First pigs born in Mexico from in vitro produced embryos, *Tec. Pec. Mex.* 43 (2005) 425–432.
- [10] Y. Ducolomb, H. Gonzalez-Marquez, R. Fierro, I. Jimenez, E. Casas, D. Flores, E. Bonilla, Z. Salazar, M. Betancourt, Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on *in vitro* fertilization, *Theriogenology* 79 (2013) 896–904.
- [11] I. Egerszegi, T. Somfai, M. Nakai, F. Tanihara, J. Noguchi, H. Kaneko, T. Nagai, J. Ratky, K. Kikuchi, Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after in vitro maturation in a porcine model, *Cryobiology* 67 (2013) 287–292.
- [12] B. Ekser, M. Ezzelarab, H. Hara, D.J. van der Windt, M. Wijkstrom, R. Bottino, M. Trucco, D.K. Cooper, Clinical xenotransplantation: the next medical revolution?, *Lancet* 379 (2012) 672–683.
- [13] F. Fernandez-Reyes, Y. Ducolomb, S. Romo, E. Casas, Z. Salazar, M. Betancourt, Viability, maturation and embryo development in vitro of vitrified immature and porcine oocytes, *Cryobiology* 64 (2012) 261–266.
- [14] S.P. Flaherty, D. Payne, N.J. Swann, C.D. Matthews, Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection, *Hum. Reprod.* 10 (1995) 2623–2629.
- [15] T. Fujihira, R. Kishida, Y. Fukui, Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI, effects of cytochalasin B and cryoprotectants, *Cryobiology* 49 (2004) 286–290.
- [16] E. García-Mengual, E. García-Roselló, J. Alfonso, I. Salvador, A. Cebrían-Serrano, M.A. Silvestre, Viability of ICSI oocytes after caffeine treatment and sperm membrane removal with Triton X-100 in pigs, *Theriogenology* 79 (2011) 1658–1666.
- [17] M.A. Gil, M. Ruiz, J.M. Vazquez, J. Roca, B.N. Day, E.A. Martinez, Effect of short periods of sperm-oocyte coincubation during in vitro fertilization on embryo development in pigs, *Theriogenology* 62 (2004) 544–552.
- [18] M. Gomez, J. Catt, G. Evans, W. Maxwell, Effect of culture, incubation and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, *Reprod. Fertil. Dev.* 9 (1997) 665–673.
- [19] M. Gomez, J. Catt, G. Evans, M. Maxwell, Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), *Reprod. Fertil. Dev.* 10 (1998) 197–205.
- [20] M. Gomez, J. Catt, G. Evans, M. Maxwell, Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization, *Theriogenology* 49 (1998) 1143–1154.
- [21] Y.M. Han, L.R. Abeydeera, J.H. Kim, H.B. Moon, R.A. Cabot, Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced in vitro, *Biol. Reprod.* 60 (1999) 1110–1113.
- [22] Y. Hao, N. Mathialagan, E. Walters, J. Mao, L. Lai, D. Becker, W. Li, J. Crister, R.S. Prather, Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes, *Biol. Reprod.* 75 (2006) 726–733.
- [23] L. Hewitson, C. Simerly, T. Dominko, G. Schatten, Cellular and molecular events after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, *Theriogenology* 53 (2000) 95–104.
- [24] R.H. Hunter, Sperm-egg interactions in the pig: monospermy, extensive polyspermy, and the formation of chromatin aggregates, *J. Anat.* 1976 (122) (1991) 43–59.
- [25] J.E. Hunter, B.J. Fuller, A. Bernard, A. Jackson, R.W. Shaw, Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants; initial studies on fertilization and embryonic development, *Hum. Reprod.* 10 (1995) 1184–1188.
- [26] V. Isachenko, J.L. Alabart, F. Naworth, E. Isachenko, G. Vajta, J. Folch, The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both?, *Cryo Lett* 22 (2001) 157–162.
- [27] R.M. Kamel, Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown, *J. Reprod. Infertility* 14 (2013) 96–109.
- [28] J.W. Lee, X.C. Tian, X. Yang, Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection, *Biol. Reprod.* 68 (2003) 1341–1347.
- [29] X. Li, K. Hamano, X.Q. Qian, K. Funauchi, M. Furudate, Y. Minato, Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection, *Zygote* 7 (1999) 233–237.
- [30] Y.Y. Liang, K. Srirattana, T. Phermthai, T. Somfai, T. Nagai, R. Parnpai, Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection, *Cryobiology* 65 (2012) 151–156.
- [31] Z. Machaty, B.N. Day, R.S. Prather, Development of early porcine embryos in vitro and in vivo, *Biol. Reprod.* 59 (1998) 451–455.
- [32] A. Martino, J.W. Pollard, S.P. Leibo, Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence, *Mol. Reprod. Dev.* 45 (1996) 503–512.
- [33] R. Morato, M. Castillo-Martin, M. Yeste, S. Bonet, Cryotolerance of porcine in vitro-produced blastocysts relies on blastocyst stage and length of in vitro culture prior to vitrification, *Reprod. Fertil. Dev.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1071/RD14203>.
- [34] H. Nagashima, N. Kashiwazaki, R.J. Ashman, C.G. Grupen, R.F. Seamark, M.B. Nottle, Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling, *Biol. Reprod.* 51 (1994) 618–622.
- [35] G. Palermo, H. Joris, P. Devroey, A.C. Van-Steirghem, Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte, *Lancet* 340 (1992) 17–18.
- [36] L. Parmegiani, G.E. Cognigni, W. Clampaglia, P. Pocognoli, F. Marchi, M. Filicori, Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection, *J. Assist. Reprod. Genet.* 1 (2010) 13–16.
- [37] J.R. Prentice-Biensch, J. Singh, R.J. Mapletoft, M. Anzar, Vitrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: effect of cryoprotectants, the vitrification procedure and warming time on cleavage and embryo development, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10 (2012) 73.
- [38] C. Rojas, M.J. Palomo, J.L. Albarracin, T. Mogas, Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments, *Cryobiology* 49 (2004) 211–220.
- [39] R. Romar, P. Coy, D. Rath, Maturation conditions and boar affect timing of cortical reaction in porcine oocytes, *Theriogenology* 78 (2012) 1126–1139.
- [40] J. Sanchez-Osorio, C. Cuello, M.A. Gil, C. Almiñana, I. Parrilla, I. Caballero, E.M. Garcia, J.M. Vazquez, J. Roca, E.A. Martinez, Factors affecting the success rate of porcine embryo vitrification by the open pulled straw method, *Anim. Reprod. Sci.* 108 (2008) 334–344.
- [41] J. Sánchez-Osorio, C. Cuello, M.A. Gil, I. Parrilla, C. Maside, C. Albiñana, X. Lucas, J. Roca, J.M. Vázquez, E.A. Martínez, Vitrification and warming of in vivo-derived porcine embryos in a chemically defined medium, *Theriogenology* 73 (2010) 300–308.
- [42] W.Q. Shi, S.E. Zhu, D. Zhang, W.H. Wang, G.L. Tang, Y.P. Hou, S.J. Tian, Improved development by taxol pretreatment after vitrification of in vitro matured porcine oocytes, *Reproduction* 131 (2006) 795–804.
- [43] A. Shirazi, E. Ostad-Hosseini, E. Ahmadi, B. Heidari, N. Shams-Esfandabadi, In vitro development competence of ICSI-derived activated ovine embryos, *Theriogenology* 71 (2009) 342–348.
- [44] T. Somfai, M. Ozawa, J. Noguchi, H. Kaneko, M. Nakai, N. Maedomari, J. Ito, N. Kashiwazaki, T. Nagai, K. Kikuchi, Live piglets derived from in vitro produced zygotes vitrified at the pronuclear stage, *Biol. Reprod.* 80 (2008) 42–49.
- [45] T. Somfai, K. Yoshioka, F. Tanihara, H. Kaneko, J. Noguchi, N. Kashiwazaki, T. Nagai, K. Kikuchi, Generation of live piglets from cryopreserved oocytes for the first time using a defined system for in vitro embryo production, *PLOS ONE* 9 (2014) e97731.
- [46] P.C. Steptoe, R.G. Edwards, Birth after the reimplantation of a human embryo, *Lancet* 2 (1978) 366.
- [47] K. Tajima, M. Orisaka, H. Yata, K. Goto, K. Hosokawa, F. Kotsuji, Role of granulosa and theca cell interactions in ovarian follicular maturation, *Microsc. Res. Tech.* 69 (2006) 450–458.
- [48] K. Wigglesworth, K.B. Lee, J. Peng, M. Matzuk, J. Eppig, Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (2013) 723–729.
- [49] T. Xian-Hong, W. Li-Min, J. Ren-Tao, L. Li-Hua, L. Hong-Bing, L. Yu-Sheng, Fertilization rates are improved after IVF if the corona radiata is left intact in vitrified-warmed human oocytes, *Hum. Reprod.* 27 (2012) 3208–3214.
- [50] Y.J. Yi, G. Manandhar, M. Sutovsky, R. Li, V. Jonakova, R. Oko, C.S. Park, R.S. Prather, P. Sutovsky, Ubiquitin C-Terminal hydrolase activity is involved in sperm acrosomal function and anti polyspermy defense during porcine fertilization, *Biol. Reprod.* 77 (2007) 780–793.

RESEARCH

Open Access



An efficiency comparison of different in vitro fertilization methods: IVF, ICSI, and PICSI for embryo development to the blastocyst stage from vitrified porcine immature oocytes

Fahiel Casillas^{1,2*}, Miguel Betancourt³, Cristina Cuello⁴, Yvonne Ducolomb³, Alma López³, Lizbeth Juárez-Rojas¹ and Socorro Retana-Márquez¹

Abstract

Background: Most studies carried out to evaluate recovery and development after porcine oocyte vitrification, reported better rates when cryopreserved in embryonic development stages or zygotes, but not in immature oocytes. For this reason, many studies are performed to improve immature oocyte vitrification protocols testing the use of different cryoprotectant concentrations, cooling devices, incubation times; but only a few of them have evaluated which fertilization procedure enhances blastocyst rates in vitrified oocytes. Therefore, this study was aimed to evaluate: 1) if the sperm selection with hyaluronic acid (HA) or polyvinylpyrrolidone (PVP) before injection could play a key role in increasing fertilization and blastocyst formation and 2) the embryo developmental ability and blastocyst production of porcine immature oocytes retrieved after vitrification-warming and co-cultured with granulosa cells during IVM, using different fertilization techniques: in vitro fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and conventional ICSI with hyaluronic acid (HA) sperm selection, known as physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI) and.

Results: Sperm selected with HA-PICSI displayed a higher percentage of live/acrosome reacted status compared to those in control and exposed to PVP. Higher dead/acrosome reacted rates were obtained after PVP exposure compared to control and HA. In oocytes, viability significantly decreased after IVM in vitrified oocytes. Besides, IVM rates were not different between control denuded oocytes cultured with granulosa cells (DO-GC) and vitrified oocytes. Regarding fertilization parameters, IVF showed higher percentages of total fertilization rate than those obtained by ICSI and PICSI. However, results demonstrate that PICSI fertilization increased the blastocysts formation rate in control DO-GC and vitrified oocytes compared to IVF and ICSI.

Conclusions: To achieve high blastocyst formation rates from vitrified GV oocytes, it is recommended that sperm should be selected with HA instead of PVP before injection since high viability and acrosome reaction rates were obtained. Also, PICSI fertilization was the best method to produce higher blastocyst rates compared to the IVF and ICSI procedures.

Keywords: Porcine, Immature oocytes, Embryo development, Blastocyst, Vitrification, IVF ICSI, PICSI

* Correspondence: fahiel@xanum.uam.mx

¹Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 CDMX, Mexico

²Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 CDMX, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



Background

The improvement of oocyte cryopreservation techniques allows the creation of valuable genetic banks. The development of different oocyte cryopreservation and in vitro fertilization (IVF) methods in swine have significant applications in biomedical research and livestock production [1]. Pigs are considered an important experimental model due to their biological similarities to humans, but also as potential organ donors for xenotransplants [2]. Different cryopreservation methods such as vitrification and slow freezing are applied for organ and tissue preservation; however, gametes represent a major challenge [3]. At present, vitrification is proposed as the best method for oocyte cryopreservation [4], and several studies are performed to improve vitrification protocols testing cryoprotectant agents (CPAs) concentrations [5–7], cooling devices [8–11], co-culture systems [12, 13], incubation times and temperatures [14], but few of them are focused on establishing the best fertilization procedure for vitrified-warmed oocytes [15]. Compared to other meiotic stages and species, porcine oocytes at the germinal vesicle stage (GV) are reported to be more difficult to recover after vitrification due to their high intracytoplasmic lipid content [16, 17]. Low viability, maturation, fertilization and blastocyst rates are obtained after GV oocyte vitrification [10, 18–20], mainly due to different morphological and physiological damage caused by the exposure to high CPAs concentrations, ice crystal formation, abnormal mitochondrial distribution and plasma membrane disruption [21, 22]. Despite this, it has been previously demonstrated that vitrified porcine GV oocytes can complete their nuclear and cytoplasmic maturation, and sustain the subsequent embryo development (ED) until the blastocysts stage. Therefore, the generation of live piglets from vitrified GV oocytes, fertilized with in vitro fertilization (IVF) has already been achieved [10]; however, blastocyst rates were reported to be low (5.2%). In a previous study [15] we used intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to fertilize vitrified oocytes because it has the advantage of avoiding polyspermy and zona pellucida (ZP) hardening issues compared to IVF. However, we observed that vitrified oocytes fertilized by conventional IVF displayed higher blastocyst formation rates than those subjected to ICSI. Another study showed that it is possible to obtain blastocysts after ICSI from porcine oocytes vitrified at the GV stage [19]. However, when performing ICSI in control and vitrified oocytes, cleavage and blastocyst rates remain significantly low [19]. This fact could be due to the physiological lacks of ICSI, where some of the sperm checkpoints of natural fertilization are bypassed, such as the sperm-oocyte recognition and acrosome reaction [23–26]. Also, the sperm selection during ICSI is carried out by a visual approach based on motility and sperm

morphology, which does not reflect sperm quality. The use of polyvinylpyrrolidone (PVP) is required during ICSI for sperm immobilization; however, this molecule is known to be toxic when injected into the oocyte cytoplasm, possibly affecting fertilization and sperm head decondensation [27]. In this regard, other studies reported low ED rates after ICSI using fresh oocytes [28–30], which are mainly ascribed to an inadequate sperm selection, resulting in sperm chromatin decondensation failures and sex chromosome abnormalities [23, 25]. Therefore, some efforts to increase the efficiency of ICSI are based on the establishment of new sperm selection criteria. For this purpose, some studies performed in fresh oocytes have previously reported the use of ZP [31] or hyaluronic acid (HA) for sperm selection prior to ICSI [32]. The improvement of ICSI using HA is also known as physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI) [33, 34]. One study reported that the use of HA is superior to the use of conventional ICSI in producing chromosomally normal embryos with low aneuploidy rates, suggesting that the ED and quality rates can be significantly improved [35]. However, this study was only performed in fresh oocytes, and to our knowledge, the present study is the first one to evaluate the effect of sperm selection with HA before injection in vitrified porcine immature oocytes. During HA selection, the adhesion of sperm to an HA gel stimulates the natural sperm-granulosa cells recognition and acrosome reaction which improves fertilization [36]. This is highly important because sperm quality is also crucial for the subsequent ED and implantation. Also, other studies reported that sperm bound to HA exhibit increased viability, maturity, acrosome integrity, reduced aneuploidy and DNA fragmentation [37, 38]. For this reason, sperm selection using HA could play a key role by increasing fertilization and ED rates, not only in fresh but also in vitrified immature oocytes. Therefore, the aims of the present study were 1) to evaluate the sperm viability and acrosome status after PVP and HA exposure and 2) to evaluate if the PICSI procedure is a useful tool for improving the fertilization and ED to the blastocyst stage of vitrified porcine GV oocytes compared to IVF and ICSI.

Methods

Chemicals culture media and culture conditions

Unless otherwise stated, all reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and different culture media were prepared. For cumulus-oocytes complexes (COCs) collection and washing, Tyrode's medium containing 10 mM HEPES, 10 mM sodium lactate and 1 mg/mL polyvinyl alcohol (TL-HEPES-PVA) was used [39]. For vitrification and warming, TCM-199-HEPES (product number TCM-199: 170929 ME-044, HEPES: H4034) medium was supplemented

with 0.5 mM L-glutamine and 0.1% PVA (V-W medium). To perform *in vitro* maturation (IVM), the maturation medium (MM) was comprised of TCM-199-Earle's salts supplemented with 26.2 mM sodium bicarbonate, 0.1% PVA, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine and 10 ng/mL EGF (In Vitro, Mexico City). In control denuded oocytes cultured with granulosa cells (control DO-GC) and vitrified oocytes, IVM was performed using an oocyte-granulosa cells co-culture. Granulosa cells were collected from immature oocyte mechanical denudation in MM containing 0.1% hyaluronidase and from the follicular fluid. A total of 1×10^6 granulosa cells were added to each maturation well [40]. Briefly, 500 μ L of follicular fluid containing granulosa cells were vortexed in 0.1% hyaluronidase for 5 min, then washed twice in phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 200 X g for 5 min. The pellet was resuspended in MM and cells were counted on a Neubauer chamber. Finally, 50 μ L of the suspension were added to 4-well culture dishes. The medium used for fertilization was modified Tris-buffered (mTBM) containing 3 mM KCl, 13.1 mM NaCl, 7.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, 11 mM glucose and 5 mM sodium pyruvate, 0.4% fraction V bovine serum albumin (BSA) and 2.5 mM caffeine [41]. For embryo culture, North Carolina State University-23 (NCSU-23) medium supplemented with 0.4% BSA was used [42]. All culture media and samples were incubated under mineral oil at 38.5 °C with 5% CO_2 in air and humidity at saturation.

Oocyte collection

Porcine ovaries were obtained from pre-pubertal Landrace gilts at "Los Arcos", Edo. de México slaughterhouse and transported to the laboratory in 0.9% NaCl solution at 25 °C. The aforementioned facility has the animal health federal law authorization under the number 6265375. For COCs collection, ovarian follicles between 3 and 6 mm in diameter were aspirated using an 18-gauge needle set to a 10 mL syringe. Oocytes with intact cytoplasm and surrounded by two to four layers of cumulus cells (CC) were selected to perform all experiments.

Vitrification and warming

For vitrification, immature COCs were denuded mechanically in MM, then washed twice in V-W medium and equilibrated in the first vitrification solution containing 7.5% dimethylsulphoxide (Me_2SO) and 7.5% ethylene glycol (EG) for 3 min. Later, oocytes were exposed to the second vitrification solution containing 16% Me_2SO , 16% EG and 0.4 M sucrose for 1 min. Later, at least nine oocytes were immersed in a 2 μ L drop and loaded into the Cryolock device (Impotadora Mexicana de Materiales para Reproducción Asistida S. A. de C.V.

México). Finally, in less than 1 min, the Cryolock was plunged horizontally into liquid nitrogen and the vitrified oocytes were stored for 30 min before warming [12].

For warming, the one-step method was performed [43]. Briefly, the Cryolock was immersed vertically in a four-well dish containing 800 μ L of V-W medium with 0.13 M sucrose. Later, warmed oocytes were incubated in the same medium for 5 min and then recovered for IVM [44].

In vitro maturation (IVM)

Control DO-GC and vitrified-warmed denuded immature oocytes were washed in 500 μ L of MM three times. Afterwards, 30 to 40 oocytes were randomly distributed in a four-well dish (Thermo-Scientific Nunc, Rochester NY) containing 500 μ L of MM with 0.5 μ g/mL LH and 0.5 μ g/mL FSH for 44 h and incubated under mineral oil at 38.5 °C with 5% CO_2 in air and humidity at saturation [42]. Control DO-GC and vitrified oocytes were matured in MM adding a granulosa cell co-culture system as described above.

Oocyte selection before IVF, ICSI or PICSI

After 44 h of IVM, to perform fertilization, co-cultured granulosa cells were removed in the control DO-GC and vitrification group. Before fertilization, oocytes were evaluated by stereomicroscopy, and only matured oocytes with uniform cytoplasm and intact ZP intended to each experimental group were subjected to IVF, ICSI or PICSI. Oocytes with lysed cytoplasm membranes were considered degenerated and were discarded.

In vitro fertilization (IVF)

After IVM, mature oocytes were rinsed twice in 500 μ L of MM and later in 500 μ L of mTBM. Groups of 30 to 40 denuded oocytes from control and vitrified groups were placed into a four-well dish with 50 μ L drops of mTBM covered with mineral oil and incubated for 45 min.

To perform insemination, the semen sample was obtained from one Landrace boar, using the gloved hand method at a commercial insemination center, diluted in Duragen (Magapor, México) 1:2 (v:v), then transported to the laboratory at 16 °C within 2 h after collection. Sperm evaluation was performed and motility was determined; only if the semen sample had greater than 80% motile spermatozoa was used. Then, 5 mL of the semen sample were diluted with 5 mL of Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; In Vitro, S.A., México) medium supplemented with 0.1% BSA fraction V, 75 μ g/mL potassium penicillin G and 50 μ g/mL streptomycin sulfate. Then, this suspension was centrifuged (61 X g for 5 min). The pellet was discarded and 5 mL of the supernatant were diluted 1:1 (v:v) with DPBS and centrifuged (1900 X g for 5 min). The supernatant was discarded, and the pellet was diluted with 10 mL of DPBS and

centrifuged twice under the same conditions. Later, the pellet was diluted in 100 μ L of mTBM to assess the final sperm concentration (5×10^5 spermatozoa/mL) and after dilution, 50 μ L of the suspension were added to the medium containing oocytes. Finally, gametes were co-incubated in mTBM for 6 h.

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

Microinjection was carried out using an inverted optical differential interference contrast microscope (Nikon eclipse, TE300, Japan). Holding pipettes (COOK medical, USA) exhibit an external 130 μ m and internal 23 μ m diameter and injection pipettes (COOK medical, USA) had an outer diameter of 7 μ m and an inner diameter of 5.5 μ m, both pipettes with an angle of 30°.

For oocyte preparation, an oil covered 35 mm diameter Petri dish (Thermo-Scientific Nunc, Rochester NY) previously incubated at 38.5 °C for 2 h with eight drops of 10 μ L mTBM medium for oocytes (3 oocytes/drop) and a drop of 4 μ L of mTBM containing 10% PVP (mTBM-PVP) for spermatozoa was used. A 1 μ L drop of mTBM medium with the sperm sample was added in the extreme of the 4 μ L drop of 10% PVP. To carry out microinjection, progressive motile and normal sperm were immobilized by hitting its tail with the injection needle. Sperm capture was performed by the introduction of the tail into the injection pipette. Then, mature oocytes were aspirated carefully by the holding pipette to prevent polar body damage. The sperm was carefully expelled from inside the injection needle and reloaded for washing to remove the PVP surrounding the sperm before injection. Subsequently, in the position of the three o'clock, the injection pipette was inserted into the oocyte so that the sperm head could be in touch with the cytoplasm to facilitate oocyte activation. To ensure that the injection took place correctly, a small volume of cytoplasm was aspirated and immediately after, the sperm was introduced. Micropipettes were removed and the oocyte was released. Finally, microinjected oocytes were washed twice and IVC [15].

Physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI)

A 1 μ L sperm droplet from the diluted sample described formerly (when performing IVF) was added to the PICSI dish (ORIGIO, Denmark) containing a previously hydrated HA gel drop. To hydrate the gel drop, 1 μ L of MM was added in each drop and incubated at 38.5 °C for 3 min. Before injection, the Petri dish containing the sperm sample was incubated at 38.5 °C for 15 min. After that, only spermatozoa bound to the HA drop were selected and subsequently injected into the oocytes as described above by the ICSI method.

Evaluation of the sperm viability and acrosomal status

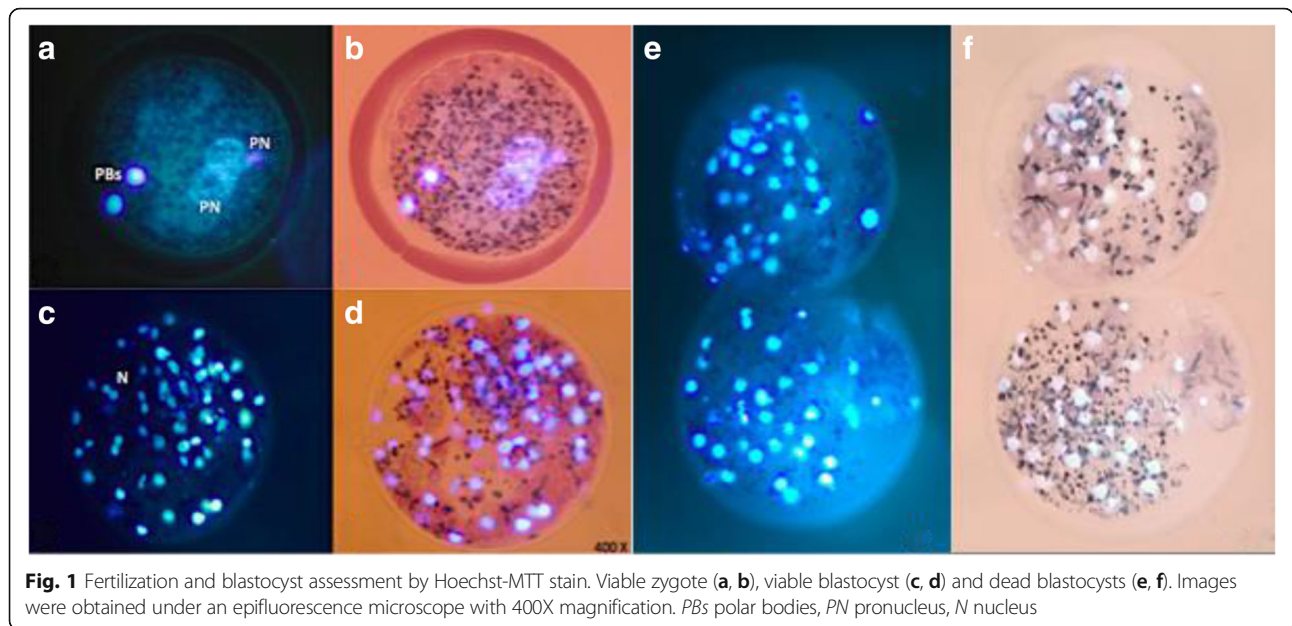
Sperm samples used for ICSI or PICSI were stained with propidium iodide (PI) and fluorescein isothiocyanate lectin from the peanut plant, *Arachis hypogaea* (FITC-PNA) for simultaneous evaluation of sperm viability and acrosomal status, respectively. For evaluation, 5 μ L of the sperm sample were diluted in 100 μ L of mTBM containing 5 μ L of PI: 1000 μ g/mL solution in distilled water and 5 μ L of FITC-PNA: 1000 μ g/mL solution in PBS. The sample was homogenized and then incubated for 5 min. Later, 10 μ L of the suspension were fixed with 10 μ L of 1.6% glutaraldehyde on a slide and evaluated under an epifluorescence microscope (Zeiss Axiostar) with a FITC-TRITC filter set. Sperm observations were classified as follows: live/non-acrosome reacted (A/NAR): positive FITC-PNA at the acrosome and negative PI at the post-acrosomal region. Live/acrosome reacted (A/AR): both FITC-PNA and PI negative. Dead/ non-acrosome reacted (D/NAR): both FITC-PNA and PI positive. Dead/acrosome reacted (D/AR): negative FITC-PNA and positive PI [44].

Evaluation of oocyte viability

Viability was measured at T 0 h = immediately after collection or vitrification and at T 44 h = after IVM. Oocytes were added in 100 μ L drop of 0.5 mg/mL Thiazolyl blue (MTT) diluted in PBS. After 1 h, oocytes were analyzed under a light microscope (Zeiss Axiostar) and classified as viable cells (with purple coloration) and non-viable (colorless).

Evaluation of maturation and fertilization parameters

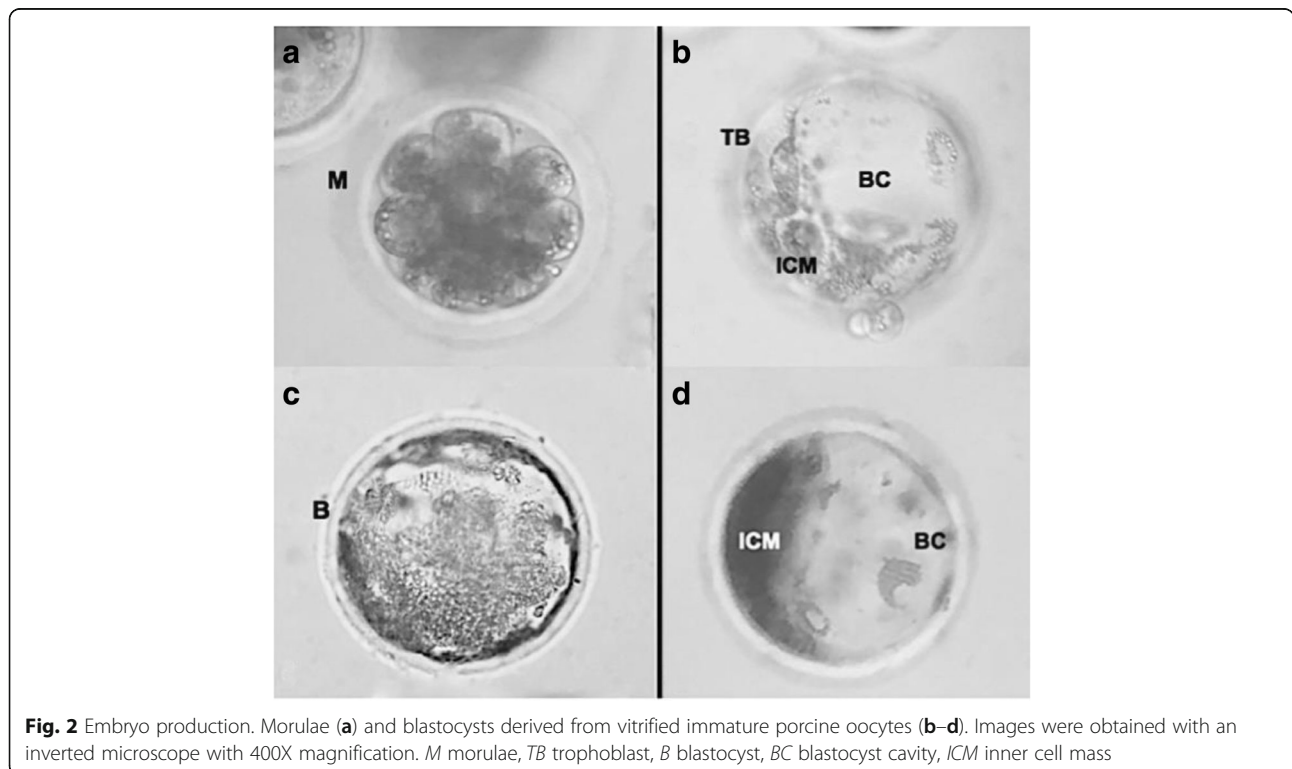
For IVM and IVF parameters, oocytes were stained using 10 μ g/mL bisbenzimidazole (Hoechst 33,342) diluted in PBS for 40 min and washed in PBS. The oocytes were fixed with 2% glutaraldehyde and mounted in a PBS-glycerol solution (1:9). Oocytes and putative zygotes were analyzed under an epifluorescence microscope (Zeiss Axiostar) at 400 X magnification. For maturation parameters evaluation, a random subset of oocytes was fixed after 44 h of IVM and classified as: immature, those oocytes in GV or in metaphase I (MI) and matured, those in metaphase II (MII) [45]. Fertilization parameters were assessed 16 h after IVF or injection in a subset of putative zygotes. Fertilization was evaluated by visualizing pronucleus (PN) formation by the Hoechst staining method. Oocytes were considered activated showing: one pronucleus (PN), monospermic: 2 PN + 2 PBs (Fig. 1, a and b), and polyspermic: > 2PN [46]. Total fertilization rate was calculated as % 2PN + > 2PN oocytes/total oocytes and non-fertilized as % non-pronuclear formation/total oocytes.



Embryo culture and evaluation of the embryo development, blastocyst quality and viability

After 6 h of gametes co-incubation during IVF or immediately after injection (ICSI and PICSI), 30 to 40 putative zygotes were transferred to four-well dishes containing 500 µL drops of NCSU-23. The embryo cleavage (number of zygotes cleaved per total cultivated) and blastocyst (number of blastocysts per total cultivated)

rates were determined at 48 and 168 h after IVC, respectively, by morphological evaluation under an inverted microscope (Olympus Optical) (Fig. 2). At day 7 (d0 = day of IVF or injection) to count the total number of nuclei, blastocysts were stained with 10 µg/mL bisbenzimidazole (Hoechst 33,342) in MM for 40 min and evaluated (Zeiss Axiostar) at 400 X magnification (Fig. 1, c and e). For cell viability assessment, day 7 blastocysts



were added in 100 μ L drop of 0.5 mg/mL MTT diluted in PBS. After 1 h, embryos were analyzed under a light microscope (Zeiss Axiostar) and classified as viable (with purple coloration) (Fig. 1, d) and non-viable (colorless) (Fig. 1, f). Results are presented as percentages of viable cells in blastocysts.

Experimental design

Experiment 1: Viability and acrosomal status of PVP exposed spermatozoa and HA-bound sperm

Three replicates were performed to compare the viability and acrosomal status of spermatozoa diluted for ICSI in mTBM and exposed to PVP or HA. The number of sperm evaluated in each replicate was $n = 200$ per treatment. Sperm sample was divided into three groups: 1) non-treated spermatozoa (Control group, $n = 600$), 2) spermatozoa treated with PVP (PVP-ICSI, $n = 600$) and 3) spermatozoa treated with HA (HA-PICSI, $n = 600$). Sperm viability and acrosome status were evaluated 15 min after treatment in all groups using the FITC-PNA-PI stain.

Experiment 2: Oocyte viability, IVM and IVF parameters obtained after GV oocyte vitrification

Oocytes used to evaluate each parameter correspond to independent samples. At least five experiments were performed to evaluate oocyte viability and maturation in fresh and vitrified oocytes. Viability was assessed immediately after selection (T 0 h) (Control DO-GC, $n = 80$ and Vitrification, $n = 67$) and at the end of IVM (T 44 h) (Control DO-GC, $n = 60$ and Vitrification, $n = 67$). After IVM, oocytes were fixed to assess the maturation rate (Control DO-GC, $n = 100$ and Vitrification, $n = 121$). To evaluate IVF parameters, three replicates were performed and the oocytes were distributed in the following groups: 1) non-vitrified oocytes subjected to IVF (Control DO-GC, $n = 41$), ICSI (Control DO-GC, $n = 30$), and PICSI (Control DO-GC, $n = 45$); 2) vitrified GV oocytes matured and subjected to IVF (Vitrification, $n = 62$), ICSI (Vitrification, $n = 43$) and PICSI (Vitrification, $n = 40$). After fertilization, oocytes were cultured for 16 h and fixed to evaluate IVF parameters.

Experiment 3: ED and blastocyst quality obtained with vitrified GV oocytes after IVF, ICSI or PICSI

Ten replicates were performed to evaluate ED and three for blastocyst quality. Fresh and vitrified immature oocytes were matured and then randomly allocated in the following groups: 1) non-vitrified oocytes subjected to IVF (Control DO-GC, $n = 100$), ICSI (Control DO-GC, $n = 74$), and PICSI (Control DO-GC, $n = 60$), 2) vitrified GV oocytes subjected to IVF (Vitrification, $n = 210$), ICSI (Vitrification, $n = 113$) and PICSI (Vitrification, $n = 158$). Selected oocytes from each experimental group were subjected to IVF, ICSI or PICSI and cultured as described above to evaluate ED.

Statistical analysis

To evaluate sperm viability and acrosomal status, oocyte viability, maturation, fertilization parameters, ED and blastocyst quality, data were analysed using ANOVA followed by a non-parametric Duncan test using number cruncher statistical software (NCSS¹¹). Percentage data are presented as mean \pm standard deviation (SD) values. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Spermatozoa viability and acrosomal status

In experiment 1, it was observed that both groups of treated spermatozoa differed ($P < 0.05$) from the control group in terms of the percentage of A/AR spermatozoa (Table 1). Higher A/AR sperm rate was obtained in the HA-PICSI group ($P < 0.05$) when compared to control and PVP. No significant difference was observed between the control and HA-PICSI group in D/AR rates. However, results demonstrate that PVP exposure significantly affects viability and AR (D/AR). The HA-PICSI group displayed lower A/NRA rates than control and PVP ($P < 0.05$) and no differences were obtained in all D/NAR sperm ($P > 0.05$) groups.

Oocyte viability, IVM and IVF parameters obtained after GV oocyte vitrification

In experiment 2, oocyte viability after vitrification (T 0 h) was not affected compared to control DO-GC; however, it decreased significantly after IVM (T 44 h) up

Table 1 Viability and acrosomal status in spermatozoa selected for ICSI or PICSI

Treatment	Total Spermatozoa <i>n</i>	A/AR (%)	D/AR (%)	A/NAR (%)	D/NAR (%)
Control	600	432 (72 \pm 1.4) ^a	29 (5 \pm 1.4) ^a	108 (18 \pm 1.8) ^a	31 (5 \pm 0.4) ^a
PVP-ICSI	600	319 (53 \pm 0.9) ^b	180 (30 \pm 1.1) ^b	82 (14 \pm 2.3) ^a	19 (3 \pm 0.2) ^a
HA-PICSI	600	504 (84 \pm 2.3) ^c	50 (8 \pm 1.9) ^a	42 (7 \pm 1.8) ^b	4 (1 \pm 0.3) ^a

Percentage data are presented as mean \pm SD values

PVP Polyvinilpyrrolidone, HA Hyaluronic acid, A/AR live/acrosome reacted, D/AR dead/acrosome reacted, A/NAR live/non-acrosome reacted, D/NAR dead/non-acrosome reacted, *n* number of sperm examined

^{a,b,c}Values in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

to 66% in the vitrification group (Table 2). Regarding maturation, the percentage of MII oocytes in control DO-GC and vitrified oocytes were not statistically different. However, the percentage of oocytes in GV was higher in control DO-GC compared to vitrified oocytes. Also, GVB (MI + MII) rates were higher ($P < 0.05$) in vitrified oocytes compared to control DO-GC (Table 3). Regarding fertilization parameters, pronuclear formation was evaluated and 2PN rates were higher in control DO-GC, and vitrified IVF oocytes than ICSI and vitrified PICS groups. Also, percentages up to 20% of >2PN were obtained after IVF. The total fertilization rate was significantly higher after IVF in control and vitrified oocytes compared to ICSI and PICS. Lower fertilization rates were obtained after ICSI than IVF and PICS. Consequently, higher non-fertilized rates (non pronuclear formation) were obtained after ICSI compared to IVF and PICS procedures (Table 4).

Blastocyst formation obtained with vitrified GV oocytes

In experiment 3, vitrification did not impair the embryo cleavage rates obtained after IVF, ICSI and PICS (Table 5). Cleavage rates were not statistically different between IVF and PICS procedures. However, cleavage decreased ($P < 0.05$) after ICSI. Blastocyst formation was significantly higher after PICS compared to IVF and ICSI. Also, higher ($P < 0.05$) percentages of viable cells in blastocysts were obtained after PICS and ICSI control DO-GC group compared to IVF. In terms of total number of nuclei, IVF and PICS were not statistically different; however, it decreased significantly after ICSI.

Discussion

Experiment 1 results indicated that HA-PICS sperm displayed higher A/AR rates than control and PVP exposed sperm. For fertilization, high A/AR rates are needed to promote sperm head decondensation. Also, reduced D/AR, A/NAR and D/NAR sperm were obtained after HA exposure. Compared to IVF and PICS, during ICSI, PVP is often used for sperm manipulation decreasing motility and facilitating capture. However, it was reported that PVP could be toxic for the spermatozoa [47], reducing fertilization [27], male PN formation and blastocyst development [48]. These observations agree with our results, where the PVP exposed

spermatozoa displayed a higher proportion of D/AR sperm than those exposed to HA and control, suggesting that the HA does not affect sperm viability. Also, the HA-binding mechanism is related to sperm maturity [49]. Only mature sperm have HA specific ligand-receptors, which are implicated in the fertilization potential. Thus, conventional sperm preparation techniques prior to fertilization [50] such as removal of seminal plasma (sperm washing), filtration, centrifugation, swim up, PVP, and observational selection based on motility, have important limitations. These procedures do not select functional, mature and competent spermatozoa, and are possibly involved in reducing sperm viability, fertilization and ED [38, 51]. Important aspects of sperm functions such as motility; maturation and capacitation appear to be partially mediated through HA [52]. In human and porcine oviduct fluid, HA is also found [36], suggesting that great amounts of HA are in contact with the sperm through the oviduct, possibly maintaining their viability until fertilization. Interactions between the oviduct fluid and sperm are required for fertilization. Only mature sperm have hyaluronic specific ligand-receptor that facilitates HA-binding, hyaluronidase activity, ZP recognition and acrosome reaction [53, 54]. Therefore, our results demonstrate that sperm viability is less affected when sperm are exposed to HA ($P < 0.05$).

Experiment 2 results demonstrate that oocyte viability is not affected immediately after vitrification (T 0 h). However, it was significantly reduced after IVM (T 44 h) in the vitrification group compared to control DO-GC. In agreement, other studies reported that viability decreases after IVM in vitrified porcine [55] and goat oocytes and embryos [56]. This fact could be due to the high sensitivity of the GV oocytes during vitrification compared to other meiotic or developmental stages [22], mainly because of their high lipid content [16], reducing CPAs permeation, causing cell damage and lowering viability [19]. Other studies support that the oocyte viability after vitrification decreases after IVC [12, 15, 57, 58]. This fact could be since, during IVC, O₂ and reactive oxygen species levels increase, affecting oocyte viability [59]. Also, buffalo [60] and porcine oocytes [61] exhibit an increased intracytoplasmic lipid content [16], affecting in vitrified oocytes the glutathione levels and increased production of H₂O₂, decreasing viability rates [61]. Concerning maturation, in the present study, it was possible to obtain maturation rates up to 46% in control DO-GC and 54% after vitrification. In agreement, several studies reported rates from 3 to 61% MII oocytes after GV oocyte vitrification [10, 18, 19, 58]. Also, our results indicate that maturation was not affected in vitrified GV oocytes compared to control DO-GC. Other studies indicate that porcine GV oocytes are less cryotolerant. Other factors responsible for decreasing IVM rates after

Table 2 Viability of porcine oocytes after vitrification and IVM

Treatment	Viability T 0 h (%)	Viability after IVM T 44 h (%)
Control (DO-GC)	75/80 (94 ± 0.8) ^a	52/60 (87 ± 2.3) ^a
Vitrification	65/67 (97 ± 0.2) ^a	44/67 (66 ± 2.1) ^b

Percentage data are presented as mean ± SD values

DO-GC Denuded oocytes cultured with granulosa cells

^{a,b}Values in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 3 IVM of porcine oocytes after vitrification

Treatment	Total Oocyte n	Maturation MII (%)	Meiotic stages (%)		
			GV	MI	GVB
Control (DO-GC)	100	46 (46 ± 4) ^a	49 (49 ± 1.8) ^a	5 (5 ± 0.3) ^a	51 (51 ± 1.2) ^a
Vitrification	121	65 (54 ± 1.2) ^a	44 (36 ± 4.3) ^b	12 (10 ± 0.6) ^a	77 (64 ± 3.2) ^b

Percentage data are presented as mean ± SD values

DO-GC Denuded oocytes cultured with granulosa cells, GV Germinal vesicle, MI Metaphase I, MII Metaphase II, GVB Germinal vesicle breakdown (MI + MII), n number of oocytes examined

^{a,b}Values in the same column with different letters are significantly different (P < 0.05)

vitrification include ZP damage, reduced mitochondrial matrix density and irreversible cytoskeleton damage [22, 62]. In the present study, the DO co-cultured with isolated CC can partially recover meiotic and developmental competence. These cells have a pH regulatory mechanism during culture and paracrine factors display antioxidant properties allowing maturation [63, 64]. However, co-culture of DO with granulosa cells does not reestablish gap junctions and IVM rates remain low. Premature nuclear maturation, oocyte aging and GAP junction damage occurs after vitrification [18, 22, 65]. Regarding fertilization, several attempts were made to increase IVF and ED rates of vitrified porcine GV oocytes [10, 12, 15]. However, embryo production rates remain low due to a high incidence of vitrification-warming injuries [22]. In the present study, higher 1PN + 2PBs rates were obtained after IVF, control ICSI and PICS than the vitrified ICSI group, suggesting that low oocyte activation and insufficient sperm head decondensation is obtained after ICSI. When evaluating pronuclear formation, higher 2PN rates were obtained after IVF and PICS than the ICSI procedure. Other studies performed in control and vitrified GV oocytes reported 2PN rates up to 43 and 33%, respectively [58], 23 and 13%, respectively [66] and fresh oocytes [67, 68].

Nevertheless, significantly reduced male PN formation was obtained after ICSI. Also, results indicate that the IVF procedure increases total fertilization rates compared to ICSI and PICS. However, with the IVF procedure, polyspermy (>2PN) rates up to 13–20% are obtained and polyspermic fertilization is one of the leading causes in producing low quality embryos. Therefore, the IVF method selection, sperm and oocyte factors could have detrimental effects on the fertilization and ED potential. In agreement to our results, another study reported that reduced oocyte activation and male PN formation are the main causes of low ICSI efficiency [69]. Results obtained in the present study demonstrate that less PN formation (non-fertilized oocytes) is obtained after ICSI compared to IVF and PICS. Therefore, sperm selection with PVP may lead to a reduced PN formation. The ICSI efficiency was previously tested; results obtained in other studies showed 55% of 2PN fertilization in control oocytes that can be improved using roscovitine up to 72% [2]. Also, oocyte activation with ionomycin in parthenogenetic oocytes or calcium ionophore and sperm selection before injection with ZP binding were performed in porcine [70, 71] and ovine oocytes [44]. However, significantly low fertilization and cleavage rates were obtained. In the present study, the

Table 4 In vitro fertilization parameters of fresh and vitrified oocytes

Treatment	Total Oocyte n	Pronuclear formation (%)			Total Fertilization	Non-fertilized
		1PN	2PN + 2 PBs	>2PN		
IVF						
Control (DO-GC)	41	10 (24 ± 1.2) ^a	21 (51 ± 3.4) ^a	8 (20 ± 5) ^a	29 (71 ± 2) ^a	2 (5 ± 1.3) ^a
Vitrification	62	16 (26 ± 3.2) ^a	38 (61 ± 4.3) ^a	8 (13 ± 2.8) ^a	46 (75 ± 3.2) ^a	–
ICSI						
Control (DO-GC)	30	5 (17 ± 8) ^a	10 (33 ± 4.2) ^b	.	10 (33 ± 4.3) ^b	15 (50 ± 1.1) ^b
Vitrification	43	3 (7 ± 1.9) ^b	15 (35 ± 8) ^b	–	15 (35 ± 8) ^b	25 (58 ± 1.2) ^b
PICS						
Control (DO-GC)	45	10 (22 ± 4) ^a	22 (49 ± 9.9) ^a	–	22 (49 ± 9.9) ^c	13 (29 ± 6.2) ^c
Vitrification	40	8 (20 ± 3) ^a	18 (45 ± 5.6) ^c	–	18 (45 ± 5.6) ^c	14 (35 ± 1.4) ^c

DO-GC Denuded oocytes cultured with granulosa cells, PBs polar bodies, PN pronucleus,

Total Fertilization = counted as 2PN + >2PN/total oocytes

Non-fertilized = non pronuclear formation/total oocytes

Percentage data are presented as mean ± SD values

^{a,b,c}Values in the same column with different letters are significantly different (P < 0.05)

Table 5 In vitro embryo development and blastocyst quality of fresh and vitrified oocytes

Treatment	Total n	Cleavage (%)	Blastocyst (%)	Viable cells in blastocysts %	Total no. of nuclei (means \pm S.D.)
IVF					
Control (DO-GC)	100	73 (73 \pm 3.4) ^a	15 (15 \pm 1.2) ^a	82 \pm 3 ^a	50 \pm 0.6 ^a
Vitrification	210	142 (68 \pm 2) ^a	30 (14 \pm 1.8) ^a	70 \pm 5 ^b	46 \pm 3 ^a
ICSI					
Control (DO-GC)	74	33 (45 \pm 2) ^b	9 (12 \pm 0.3) ^a	100 ^c	44 \pm 0.9 ^b
Vitrification	113	45 (40 \pm 9) ^b	10 (9 \pm 0.2) ^b	42 \pm 5 ^d	41 \pm 2 ^b
PICSI					
Control (DO-GC)	60	38 (63 \pm 2) ^a	18 (30 \pm 1.5) ^c	100 ^c	50 \pm 2.5 ^a
Vitrification	158	99 (63 \pm 3.5) ^a	39 (25 \pm 3) ^c	100 ^c	54 \pm 5 ^a

DO-GC Denuded oocytes cultured with granulosa cells, n number of embryos examined

Cell viability was considered as the percentage of viable cells in blastocysts

Percentage data are presented as mean \pm SD values

Cleavage = number of zygotes cleaved per total cultivated

Blastocyst = number of blastocysts per total cultivated

^{a,b,c,d}Values in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

use of HA increased 2PN formation up to 45%. Recently, it was reported that the use of lipase to select and inject oocytes, resulted in 29% of 2PN formation [48]. In addition, this study also evaluated the efficiency of PVP, reporting 24% of 2PN formation [48], similar to those obtained in the present study (35%). Fertilization and ED success depends on the quality of the spermatozoa selected for injection, but this is not possible to achieve by ICSI.

In experiment 3, regarding cleavage results, IVF and PICSI were not statistically different. However, significantly reduced cleavage rates were obtained after ICSI. Therefore, results demonstrate that sperm selection is crucial for improving ED. PVP sperm selection reduces viability, and could increase DNA fragmentation rates resulting in less oocyte activation, PN formation and ED. In agreement, other studies reported low blastocyst production after ICSI, in fresh oocytes (4–14%) [2, 19]. Our results demonstrate that cleavage and blastocyst rates are significantly affected after ICSI compared to IVF and PICSI. In contrast, another study reported blastocyst rates up to 40% in pigs after ICSI; however, different culture media and BSA supplementation were used [72]. When performing PICSI, blastocyst formation was improved in control DO-GC (30%) and in vitrified oocytes (25%). To increase ED rates, other studies add 10% of fetal bovine serum (FBS) or porcine follicular fluid (pFF) during IVM or IVF culture [35, 58, 73]; however, we avoided its use. In the present study, we obtained similar results in terms of cleavage rate with fresh oocytes in all treatments without using FBS or pFF. Supplementation with FBS or pFF has important limitations since pathogens such as viruses are present. Regarding blastocyst viability and quality, results indicate that viable day 7 blastocysts can be obtained by PICSI of matured oocytes

derived from vitrified GV oocytes. Higher percentages of viable cells in blastocysts and a total number of nuclei were obtained by PICSI than when using IVF and ICSI. Our results demonstrate that sperm selection with HA, ensures the injection of a sperm that has completed its maturation and that is able to recognize and attach to the HA, improving blastocysts formation. However, sperm selection with PVP during ICSI can significantly reduce the oocyte developmental potential to the blastocyst stage. Therefore, superior quality blastocysts can be obtained after HA sperm selection during PICSI. It has been stated that the contribution of sperm towards embryogenesis can be divided into two periods: the early period (fertilization to < 8-cell stage) and the late period (8-cell stage to birth) [74]. In the early period, an inadequate sperm selection can affect fertilization, syngamy and the mitotic division [75, 76]. In the late period, sperm can influence embryogenesis by a genome way. If the genome is altered by DNA fragmentation, it may result in a poor blastocyst development, lower implantation, early pregnancy loss or abortion [74]. According to this, other studies with PICSI fertilization have reported that HA-bound injected sperm increased embryo production in human [34]. But also, low pregnancy loss, high pregnancy rates [77, 78], and high DNA integrity [79] are obtained by PICSI. Therefore, our results demonstrate that sperm selection with HA improves blastocysts rates not only in control but also in vitrified oocytes. Compared to PVP-ICSI, sperm selection with HA improved blastocyst formation. The PICSI mechanism by which ED is improved is that only mature and competent sperm hold hyaluronan specific ligand receptors, facilitating fertilization. HA-selected sperm exhibit normal head morphology, reduced DNA fragmentation, reduced chromosomal aneuploidy rates and better

fertilization potential [37]. In contrast, PVP has no selective function and its use can cause DNA fragmentation rates up to 11% [34] compared to 5.3% with HA. Also, higher percentages of spermatozoa with normal nucleus are selected with HA compared to PVP (14.5% vs. 11%, respectively) [34]. Consequently, oocyte fertilization with arrested sperm maturity and DNA damage may lead to a reduced blastocyst development. Also, lower oocyte activation and PN formation rates were obtained after ICSI compared to PICSI, reducing the ED potential. Therefore, the present study suggests that the PICSI procedure is the best method to fertilize and produce blastocysts from vitrified GV oocytes. This procedure compared to the conventional IVF in porcine oocytes has several advantages: 1) during PICSI, polyspermy is avoided, 2) only one selected sperm is used per oocyte and 3) sperm selection allows the injection of a high-quality sperm. The IVP of porcine blastocysts has been difficult to achieve mainly in vitrified GV oocytes. However, if nuclear maturation is performed with a granulosa cell co-culture system and sperm are selected with HA before injection, blastocyst production can be improved. The advantages of cryopreserving GV oocytes compared to other meiotic or developmental stages are that they can be collected in a greater quantity than MII oocytes, allowing the production of a high number of blastocysts for embryo transfer. Also, to obtain GV oocytes, no ovarian stimulation is required. They can be obtained from prepubescent females; however, IVM is required.

Conclusions

To achieve high blastocyst formation rates from vitrified GV oocytes, it is recommended that sperm should be selected with HA instead of PVP before injection since high viability and acrosome reaction rates were obtained. Also, PICSI fertilization was the best method to produce higher blastocyst rates compared to the IVF and ICSI procedures.

Abbreviations

A/AR: Live/acrosome reacted; A/NAR: Live/non-acrosome reacted; ART: Assisted reproduction technologies; BC: Blastocyst cavity; BSA: Bovine serum albumin; CC: Cumulus cells; COCs: Cumulus-oocyte complexes; CPAs: Cryoprotectant agents; D/AR: Dead/acrosome reacted; D/NAR: Dead/non-acrosome reacted; DO: Denuded oocytes; DO-GC: Denuded oocytes cultured with granulosa cells; DPBS: Dulbecco's phosphate buffered saline; ED: Embryo development; EG: Ethylene glycol; EGF: Epidermal growth factor; FBS: Fetal bovine serum; FITC-PNA: Fluorescein isothiocyanate-peanut agglutinin; FSH: Follicle stimulating hormone; GAGs: Glycosaminoglycan's; GV: Germinal vesicle; GVB: Germinal vesicle breakdown; HA: Hyaluronic acid; ICM: Inner cell mass; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; IVC: In vitro culture; IVF: In vitro fertilization; IVM: In vitro maturation; LH: Luteinizing hormone; M: Morulae; Me₂SO: Dimethylsulphoxide; MI: Metaphase I; MII: Metaphase II; MM: Maturation medium; mTBM: Tris-buffered medium; MTT: Thiazolyl blue; N: Nucleus; NCSU-23: North Carolina State University 23; PBS: Phosphate buffered saline; PBs: Polar bodies; pFF: Porcine follicular fluid; PI: Propidium iodide; PICSI: Physiological intracytoplasmic sperm injection; PN: Pronucleus; PVA: Polyvinyl alcohol; PVP: Polyvinylpyrrolidone;

SD: Standard deviation; TB: Trophoblast; V-W: Vitrification and warming; ZP: Zona pellucida

Acknowledgements

The authors thank the slaughterhouse "Los Arcos", Estado de Mexico for the donation of porcine ovaries. This publication represents partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Health and Biological Sciences for Fahiel Casillas.

Funding

This work was supported by CONACYT Scholarship to Fahiel Casillas (No. 302760).

Availability of data and materials

The authors declare that they do not apply new software and databases.

Authors' contributions

Study design and direction: FC, MB, YD and SRM. Animal managing and experiments: FC. Analyzed the results and wrote the manuscript: FC, MB, YD, CC, AL, LJR and SR. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Porcine ovaries were obtained from pre-pubertal Landrace gilts at "Los Arcos", Edo. de México slaughterhouse. The aforementioned facility has the animal health federal law authorization under the number 6265375.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 CDMX, Mexico. ²Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 CDMX, Mexico. ³Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 CDMX, Mexico. ⁴Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad de Murcia, 30100 Espinardo, Spain.

Received: 30 January 2018 Accepted: 20 June 2018

Published online: 13 August 2018

References

- Dinnyes A, Liu J, Nedambale TL. Novel gamete storage. *Reprod Fertil Dev.* 2007;19:719–31.
- García-Roselló E, Coy P, García-Vázquez FA, Ruiz S, Matás C. Analysis of different factors influencing the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) yield in pigs. *Theriogenology.* 2006;66:1857–65.
- Casillas F, Retana-Márquez S, Ducolomb Y, Betancourt M. New trends in assisted reproduction techniques: cryopreservation, in vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection and physiological intracytoplasmic sperm injection. *Anat Physiol.* 2015;5:184.
- Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod.* 2012; 18(5):1–19. <https://doi.org/10.1093/humupd/dms016>.
- Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology.* 2004;48:22–35.
- Mahmoud KG, Scholkamy TH, Ahmed YF, Seidel GE Jr, Nawito MF. Effect of different combinations of cryoprotectants on in vitro maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. *Reprod Dom Anim.* 2012;45:565–71.
- Somfai T, Men NT, Noguchi J, Kaneko H, Kashiwazaki N, Kikuchi K. Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens. *J Reprod Dev.* 2015;61:571–9.

8. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos. The Cryotop method. *Theriogenology*. 2007;67:73–80.
9. Liang YY, Srirattana K, Phermthai T, Somfai T, Nagai T, Parnpai P. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Cryobiology*. 2012;65:151–6.
10. Somfai T, Yoshioka K, Tanihara F, Kaneko H, Noguchi J, Kashiwazaki N, et al. Generation of live piglets from cryopreserved oocytes for the first time using a defined system for in vitro embryo production. *PLoS One*. 2014;9:e97731.
11. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*. 2000;60-61:357–64.
12. Casillas F, Teteltila-Silvestre M, Ducolomb Y, Lemus AE, Salazar Z, Casas E, et al. Co-culture with granulosa cells improve the in vitro maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with Cryolock. *Cryobiology*. 2014;69:299–304.
13. Zhang X, Miao Y, Zhao JG, Spate L, Bennett MW, Murphy CN, et al. Porcine oocytes denuded before maturation can develop to the blastocyst stage if provided a cumulus cell-derived coculture system. *J Anim Sci*. 2010;88:2604–10.
14. Wu G, Jia B, Quan G, Xiang D, Zhang B, Shao Q, Hong Q. Vitrification of porcine immature oocytes: association of equilibration manners with warming procedures, and permeating cryoprotectants effects under two temperatures. *Cryobiology*. 2017;75:21–7.
15. Casillas F, Ducolomb Y, Lemus AE, Cuello C, Betancourt M. Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell co-culture system. *Cryobiology*. 2015;71:299–305.
16. McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JSM, Speake BK. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Rep Fert*. 2000;118:163–70.
17. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod*. 1994;51:618–22.
18. Fernandez-Reyes F, Ducolomb Y, Romo S, Casas E, Salazar Z, Betancourt M. Viability, maturation and embryo development in vitro of vitrified immature and porcine oocytes. *Cryobiology*. 2012;64:261–6.
19. Fujihira T, Kishida R, Fukui Y. Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI, effects of cytochalasin B and cryoprotectants. *Cryobiology*. 2004;49:286–90.
20. Santos RM, Barreta MH, Frajiblat M, Cucco DC, Mezzalira JC, Bunn S, et al. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. *Ciencia Rural*. 2006;36:1501–6.
21. Mavrides A, Morroll D. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *Europ J Obstet Gynecol and Reprod Biol*. 2005;118:66–70.
22. Rojas C, Palomo MJ, Albarracin JL, Mogas T. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology*. 2004;49:211–20.
23. Catt WJ, Rhodes SL. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fert Dev*. 1995;7:161–7.
24. Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1995;10:2623–9.
25. García-Mengual E, García-Roselló E, Alfonso J, Salvador J, Cebrian-Serrano A, Silvestre MA. Viability of ICSI oocytes after caffeine treatment and sperm membrane removal with triton X-100 in pigs. *Theriogenology*. 2011;79:1658–66.
26. Hewitson L, Simerly C, Dominko T, Schatten G. Cellular and molecular events after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 2000;53:95–104.
27. Kato Y, Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reprod Med Biol*. 2012;11:165–76.
28. Li X, Hamano K, Qian XQ, Funauchi K, Furudate M, Minato Y. Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*. 1999;7:233–7.
29. Shirazi A, Ostad-Hosseini E, Ahmadi E, Heidari B, Shams-Esfandabadi N. In vitro development competence of ICSI-derived activated ovine embryos. *Theriogenology*. 2009;71:342–8.
30. Xian-Hong T, Li-Min W, Ren-Tao J, Li-Hua L, Hong-Bing L, Yu-Sheng L. Fertilization rates are improved after IVF if the corona radiata is left intact in vitrified-warmed human oocytes. *Hum Reprod*. 2012;27:3208–14.
31. De-Yi L. Could using the zona pellucida bound sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) enhance the outcome of ICSI? *Asian J Androl*. 2011;13:197–8.
32. Black M, Liu DY, Bourne H, Baker HW. Comparison of outcomes of conventional intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and ICSI using sperm bound to the zona pellucida of immature oocytes. *Fertil Steril*. 2010;93:672–4.
33. Mokánszki A, Tóthné EV, Bondár B, Tándor Z, Molnár Z, Jakab A, et al. Is sperm hyaluronic acid binding ability predictive for clinical success of intracytoplasmic sperm injection: PICSI vs. ICSI? *Syst Biol Reprod Med*. 2014; 60:348–54.
34. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27:13–6.
35. Park CY, Uhm SJ, Song SJ, Kim KS, Hong SB, Chung KS, et al. Increase of ICSI efficiency with hyaluronic acid binding sperm for low aneuploidy frequency in pig. *Theriogenology*. 2005;64:1158–69.
36. Tienthai P, Kjellen L, Pertröft H, Suzuki K, Rodriguez-Martinez H. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reprod Fert Dev*. 2000;12:173–82.
37. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayil S, Delpiano E. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod BioMed Online*. 2007;14:650–3.
38. Huszar G, Ozenci CC, Cayil C, Zvaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*. 2003;79:1616–24.
39. Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol Reprod*. 1998;58:1316–20.
40. Tajima K, Orisaka M, Yata H, Goto K, Hosokawa K, Kotsuji F. Role of granulosa and theca cell interactions in ovarian follicular maturation. *Microsc Res Tech*. 2006;69:450–8.
41. Abeydeera LR, Day BN. In vitro fertilization of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*. 1997;48:537–44.
42. Abeydeera LR. In vitro fertilization and embryo development in pigs. *Reprod Suppl*. 2001;50:159–73.
43. Sánchez-Osorio J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Maside C, Almiñana C, et al. Vitrification and warming of in vivo-derived porcine embryos in a chemically defined medium. *Theriogenology*. 2010;73:300–8.
44. Hernández-Pichardo JE, Ducolomb Y, Romo S, Kjelland ME, Fierro R, Casillas F, et al. Pronuclear formation by ICSI using chemically activated ovine oocytes and zona pellucida bound sperm. *J Anim Sci Biotech*. 2016;7:65.
45. Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y, Betancourt M. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicol in Vitro*. 2010;24:224–30.
46. Martino A, Pollard JW, Leibo SP. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol Reprod Dev*. 1996;45:503–12.
47. Suzuki T, Saha S, Sumantri C, Takagi M, Boediono A. The influence of polyvinylpyrrolidone on freezing of bovine IVF blastocysts following biopsy. *Cryobiology*. 1995;32:505–10.
48. Wei Y, Fan J, Li L, Liu Z, Li K. Pretreating porcine sperm with lipase enhances developmental competence of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*. 2016;4:594–602.
49. Huszar G. Hyaluronic acid binding-mediated sperm selection for ICSI. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. *Textbook of assisted reproductive techniques*. London; 2011. p. 122–34. <https://doi.org/10.3109/9781841849713.009>.
50. Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Vet Med Int*. 2010; <https://doi.org/10.4061/2011/894767>.
51. Javed A, Mozafari F, Ashwini LS, Ganguly D. Commentary: physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI), an alternative to the standard ICSI procedure. *MOJ Anat Physiol*. 2015; <https://doi.org/10.15406/mojap.2015.01.00009>.
52. Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *Int J Androl*. 2000;23:13–21.
53. Ulbrich SE, Schoenfelder M, Thoene S, Einspanier R. Hyaluronan in the bovine oviduct-modulation of synthases and receptors during the estrous cycle. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;214:9–18.
54. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art-physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl*. 2012; 14:260–9.

55. Somfai T, Dinnyes A, Sage D, Marosan M, Carnwath JW, Ozawa M, et al. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Theriogenology*. 2006;66:415–22.
56. Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4- cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*. 2003;59:1839–50.
57. Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology*. 2007;67:238–48.
58. Somfai T, Noguchi J, Kaneko H, Nagai M, Ozawa M, Kashiwazaki N, et al. Production of good-quality porcine blastocysts by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*. 2010;73:147–56.
59. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*. 2004;82:593–600.
60. Mahmoud KGM, El-Sokary MMM, Kandiel MMM, Abou El-Roos MEA, Sosa GMS. Effects of cysteamine during in vitro maturation on viability and meiotic competence of vitrified buffalo oocytes. *Iran J Vet Res*. 2016;17:165–70.
61. Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Farhudin M, et al. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology*. 2007;55:115–26.
62. Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xiao-Lu BX, et al. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol Rep Dev*. 2006;73:1454–62.
63. Godard NM, Pukazhenthi BS, Wildt DE, Comizzoli P. Paracrine factors from cumulus-enclosed oocytes ensure the successful maturation and fertilization in vitro of denuded oocytes in the cat model. *Fertil Steril*. 2009;91:2051–60.
64. Yu-Hung L, Jiann-Loung H, Kok-Min S, Lee-Wen H, Heng-Ju C, Chii-Ruey T. Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. *Rep Biomed Onl*. 2009;19:165–70.
65. Appeltant R, Somfai T, Santos ECS, Dang-Nguyen TQ, Nagai T, Kikuchi K. Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation. *Rep Fertil Dev*. 2017;29:2419–29.
66. Egerszegi I, Somfai T, Nakai M, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, et al. Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after in vitro maturation on a porcine model. *Cryobiology*. 2013;67:287–92.
67. Appeltant R, Beek J, Vandenbergh L, Maes D, Soom AV. Increasing the cAMP concentration during in vitro maturation of pig oocytes improves cumulus maturation and subsequent fertilization in vitro. *Theriogenology*. 2015;83:344–52.
68. Romar R, Coy P, Rath D. Maturation conditions and boar affect timing of cortical reaction in porcine oocytes. *Theriogenology*. 2012;78:1126–39.
69. García-Mengual E, Silvestre MA, Salvador I, Cebrian-Serrano A, García-Rosello E. Male pronucleus formation after ICSI: effect of oocyte cysteine or sperm triton X-100 treatments. *Czech J Anim Sci*. 2015;60:241–9.
70. Che L, Lalonde A, Bordignon V. Chemical activation of parthenogenetic and nuclear transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. *Theriogenology*. 2007;67:1297–304.
71. Kolbe T, Holtz W. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium. Ionophore activation in the pig. *Theriogenology*. 1999;52:671–82.
72. Nakai M, Ozawa M, Maedomari N, Noguchi J, Kaneko H, Ito J, Onishi A, Kashiwazaki N, Kikuchi K. Delay in cleavage of porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) shows poorer embryonic development. *J Reprod Dev*. 2014;60:256–9.
73. Vatzias G, Hagen DR. Effects of porcine follicular fluid on oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biol Reprod*. 1999;60:42–8.
74. Majumdar G, Majumdar A. A prospective randomized study to evaluate the effect of hyaluronic acid sperm selection on the intracytoplasmic sperm injection outcome of patients with unexplained infertility having normal semen parameters. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30:1471–5.
75. Burrel V, Klooster K, Barker CM, Pera RR, Mayers S. Abnormal early cleavage events predict early embryo demise: sperm oxidative stress and early abnormal cleavage. *Sci Rep*. 2014;4:6598.
76. Neri QV, Lee B, Rosenwaks Z, Machaca K, Palermo GD. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Cal*. 2014;55:24–37.
77. Erberelli RF, Salgado RM, Mendes-Pereira DH, Wolff P. Hyaluronan-binding system for sperm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility. *JBRA Assist Reprod*. 2017;21:2–6.
78. Worrilow KC, Eid S, Woodhouse D, Perloe M, Smith S, Witmyer J, et al. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes-multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2013;28:306–14.
79. Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl*. 2010;31:566–72.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://www.biomedcentral.com/submissions)





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00065

Matrícula: 2151802776

Efecto de la vitrificación en la fertilización y desarrollo embrionario in vitro de ovocitos inmaduros porcinos

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 26 del mes de julio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
- DRA. ANA ELENA LEMUS BRAVO
- DRA. MARIA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MARQUEZ
- DR. JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO
- DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMIREZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR.

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



MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS
ALUMNA

REVISÓ

LIC JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DRA. ANA ELENA LEMUS BRAVO

VOCAL

DRA. MARÍA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MARQUEZ

VOCAL

DR. JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO

SECRETARIO

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMIREZ