

EFFECTO DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS SOBRE LA VIABILIDAD POSTDESCONGELACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS VITRIFICADOS

Effect of cumulus cells on postwarming viability of vitrified bovine oocytes

¹Jesús Ricardo Aké-Villanueva, ^{1*}Jesús Ricardo Aké-López, ¹Fernando Gerardo Centurión-Castro, ²Érika Alina Ordóñez-León

¹Departamento de Reproducción Animal y Mejoramiento Genético, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Apdo. 4-116 Itzimná Mérida, Yucatán, México.

*alopez@uady.mx

²Laboratorio de Fertilización *In vitro* Brasuca S.A. de C.V., Villahermosa, Tabasco, México.

Artículo científico recibido: 10 de junio de 2014, **aceptado:** 05 de septiembre de 2014

RESUMEN. Para evaluar el efecto de la presencia de las células del cúmulus en la vitrificación de ovocitos, sobre su capacidad de maduración, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*, se vitrificaron 596 ovocitos, 317 con células del cúmulus (COC) y 279 sin células del cúmulus (DND), la vitrificación se realizó con Etilenglicol+DMSO en pajillas OPS, después de la descongelación los ovocitos se maduraron *in vitro* (MIV), se fecundaron (FIV) y se cultivaron por siete días. Para valorar la MIV y FIV aproximadamente 20 % de ovocitos maduros y 20 % de ovocitos fecundados se fijaron y tiñeron con Lacmoid; la proporción de presuntos cigotos divididos se valoró 48 h después de iniciado el cultivo. Los resultados se evaluaron mediante Ji cuadrada. El porcentaje de recuperación postdescongelación de los ovocitos fue similar para ambos grupos ($p > 0.05$), la proporción de ovocitos morfológicamente normales fue ligeramente menor en el grupo DND ($p < 0.05$). La proporción de ovocitos maduros fue similar ($p > 0.05$) para COC (47.5 %) como para DND (47.8 %). El porcentaje de ovocitos penetrados después de la FIV fue bajo en ambos grupos (COC = 10.26 %; DND = 15 %; $p > 0.05$). El porcentaje de ovocitos divididos después de la FIV fue de 2.9 % para COC ($n = 6$) y 2.45 % para DND ($n = 4$; $p > 0.05$), ninguno de estos ovocitos alcanzó el estadio mórula o blastocito. Se concluye que la vitrificación de ovocitos con o sin células del cúmulus presentó bajos porcentajes de fecundación y cigotos divididos, y no se observó desarrollo embrionario.

Palabras clave: Ovocitos bovinos, células del cúmulus, FIV, MIV, vitrificación.

ABSTRACT. In order to evaluate the effect of the presence of cumulus cells on oocytes before vitrification, on their ability regarding maturation, fertilisation and embryo development *in vitro* after warming, 596 bovine oocytes were vitrified, 317 with cumulus cells (COC) and 279 without cumulus cells (DND). Vitrification was carried out using OPS straws and ethylene glycol+DMSO as cryoprotectants. After warming, the oocytes were matured *in vitro* (MIV), fertilised (FIV) and cultured for seven days. In order to evaluate MIV and FIV, around 20 % of mature oocytes and 20 % of fertilised oocytes were preserved and stained with Lacmoid. Cleavage rates were recorded 48 h after the culture started. The results were evaluated using a Ji square test. The post-warming oocyte recovery percentage was similar for both groups ($p > 0.05$). The proportion of morphologically normal oocytes was slightly lower in the DND group ($p < 0.05$). The proportion of mature oocytes was similar ($p > 0.05$) for COC (47.5 %) and DND (47.8 %). The percentage of penetrated oocytes after FIV was low in both groups (COC=10.26 %; DND=15 %; $p > 0.05$). The percentage of divided oocytes after FIV was 2.9 % for COC ($N=6$) and 2.45 % for DND ($N=4$; $p > 0.05$). No oocyte reached the morula or blastocyst stage. It is concluded that vitrification of oocytes with or without cumulus cells resulted in low percentages of fertilisation and cleavage and no embryonic development.

Key words: Bovine oocytes, cumulus cells, IVF, IVM, vitrification.

INTRODUCCIÓN

La crioconservación de ovocitos brinda la oportunidad de facilitar la implementación de diferentes tecnologías reproductivas como lo son la producción de embriones *in vitro* y la transferencia de embriones. Con la crioconservación es posible almacenar gametos de animales de alto valor genético, de especies amenazadas o de animales muertos de forma accidental, permitiendo utilizar este material en el momento en que sea deseado, haciendo a un lado el dilema ético de conservar grandes cantidades de embriones congelados (Prentice *et al.* 2011, Diez *et al.* 2012, Fernández-Reyes *et al.* 2012, Kim *et al.* 2014).

Las dos técnicas para la criopreservación de ovocitos son la congelación lenta convencional y la vitrificación (Saragusty y Arav 2011). La técnica convencional de congelación lenta, utilizada tanto para ovocitos como para embriones, presenta diversos problemas entre los cuales está la toxicidad a prolongados tiempos de exposición a los crioprotectores (CP), los ovocitos sufren de estrés osmótico y la formación de hielo intracelular, lo cual reduce los porcentajes de viabilidad después de la descongelación (Didion *et al.* 1990, Ledda *et al.* 2007). La vitrificación reduce los tiempos de exposición a los CP, al mismo tiempo, al ser una técnica de congelación ultra rápida, no se favorece la formación de cristales de hielo, los cuales son responsables de la desorganización citoplasmática (Pereira y Marques 2008, Diez *et al.* 2012), además de ser una técnica de crioconservación simple.

A pesar de que actualmente la vitrificación de ovocitos está reemplazando a la congelación lenta convencional, los resultados obtenidos en relación a la capacidad de los de poder lograr desarrollarse hasta embriones, no son satisfactorios (Fujihira *et al.* 2005, Zhou *et al.* 2010). Algunos investigadores mencionan que es necesario realizar estudios sobre modificaciones a los protocolos de vitrificación y selección de ovocitos que pudieran ayudar a mejorar las tasas de fecundación después de la vitrificación (Llitas y Chong 2009, Mullen y Fahy 2012). Entre los aspectos morfológicos del ovocito que pueden afectar los resultados de la vitrificación

se encuentran el estadio nuclear y la presencia de las células del cúmulus (Diez *et al.* 2012, Purohit *et al.* 2012), las cuales tienen importancia para que el ovocito pueda llevar a cabo su maduración y subsecuente fertilización, siendo éstas benéficas para la sobrevivencia de ovocitos criopreservados (Chian *et al.* 1994, Li *et al.* 2006, Zhou *et al.* 2010). Sin embargo, diversos investigadores señalan que la cobertura de células del cúmulus reducen la cantidad de CP que llegan al interior del ovocito, por lo que la distribución de estas sustancias en el interior del citoplasma se daría de forma desigual y los ovocitos sufren daño por congelación (Hyttel *et al.* 2000). Por su parte Diez *et al.* (2005) mencionan que además de lo anterior, los CP provocan pérdida de las conexiones entre el ovocito y las células del cúmulus, por lo que algunos autores han optado por vitrificar ovocitos sin cobertura de células del cúmulus (Purohit *et al.* 2012).

Son pocos los reportes de ovocitos vitrificados sin células del cúmulus en el caso de los bovinos (Modina *et al.* 2004, Zhou *et al.* 2010). Sin embargo, existen algunos reportes en otras especies con resultados contradictorios, por ejemplo Bogliolo *et al.* (2007) trabajando con ovinos, encontraron que se mejoró la viabilidad y la maduración citoplasmática cuando los ovocitos se vitrificaron sin las células del cúmulus. En equinos, Tharasanit *et al.* (2009) señalan que en los ovocitos vitrificados sin las células del cúmulus se reducía la capacidad de desarrollo meiótico. En el caso de la especie bovina Zhou *et al.* (2010) indican que los porcentajes de sobrevivencia y de blastocitos se reducían cuando se vitrificaba a los ovocitos sin células del cúmulus.

El vitrificar ovocitos con o sin células del cúmulus es una situación que se mantiene en debate hasta el día de hoy, cuando exista la oportunidad, se puede decidir no utilizarlos; sin embargo en ocasiones se tendrá la necesidad de crioconservar ovocitos sin las células del cúmulus o con una cubierta de pocas células. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las presencia de las células del cúmulus antes de la vitrificación, sobre la maduración, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados en la preparación de los medios se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) con excepción de donde se indique lo contrario. El medio de maduración *in vitro* (MIV) consistió de TCM-199 (Gibco-BRL, NY, USA) suplementado con 0.2 mM de piruvato de sodio, 25 μ M de bicarbonato de sodio, 0.5 μ g mL⁻¹ de FSH (Pluset, Hertape-Calier, Brazil), 100 UI mL⁻¹ de HCG (Intervet, Holland) y 1.0 μ g mL⁻¹ de estradiol.

El medio de fecundación *in vitro* (FIV) fue el Tyrodes albumin, lactate, pyruvate (TALP), suplementado con 0.2 mM de piruvato de sodio, 3 mg mL⁻¹ de BSA libre de ácidos grasos, 25 mM de bicarbonato de sodio, 13 mM de lactato de sodio, 75 μ g mL⁻¹ de kanamicina, 4 μ L mL⁻¹ de solución PHE (2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina y 250 μ M de epinefrina), y 10 μ g mL⁻¹ de heparina.

El medio de cultivo *in vitro* (CIV) fue fluido oviductal sintético (SOF) (Thompson *et al.* 1995), suplementado con 0.2 mM de L-glutamina, 0.34 mM de citrato de sodio, 2.8 mM de mioinositol, 2 % de solución MEM con aminoácidos esenciales, 0.2 mM de piruvato de sodio, 75 μ g mL⁻¹ de kanamicina, 5 mg mL⁻¹ de BSA fracción V libre de ácidos grasos.

Recolección y selección de los ovocitos

Los ovocitos (n = 596) utilizados en el presente estudio fueron recuperados de ovarios de vacas obtenidos de un rastro local (Mérida, Yucatán, México), los cuales fueron transportados desde el matadero hasta el laboratorio en un termo con solución salina (0.9 %) suplementada con kanamicina (0.007 gL⁻¹), en un lapso no mayor de 2 horas. En el laboratorio, los ovarios fueron lavados dos veces con solución salina a 37 °C y posteriormente se depositaron en un recipiente con solución salina fosfatada de Dulbecco (PBSD). La obtención de los ovocitos se realizó mediante la punción/aspiración de los folículos antrales de 2 a 8 mm de diámetro (Zhou *et al.* 2010), con una jeringa de 20 mL (Air tite) y una aguja calibre 18. El líquido folicular extraído se colocó en tubos Falco de 50 mL y se dejó sedimentar

durante 15 min en baño María, transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y el sedimento resultante se resuspendió en 10 mL de PBSD a 37 °C, el contenido del tubo se depositó en cajas de Petri (90 x 14 mm), en las cuales se procedió a la identificación y selección de los ovocitos con la ayuda de un estereomicroscopio equipado con una placa térmica a 38.5 °C.

Se seleccionaron todos los ovocitos rodeados al menos por dos capas de células del cúmulus y con ooplasma uniforme de acuerdo con lo descrito por Santos *et al.* (2008).

Tratamientos

Los ovocitos se dividieron en dos grupos: grupo COC (ovocitos con células del cúmulus intactas) y grupo DND (ovocitos a los cuales mecánicamente, se les retiró las células del cúmulus); después se procedió a la vitrificación.

Vitrificación

La vitrificación se realizó de acuerdo con lo descrito por Berthelot *et al.* (2000) y consistió en lavar los ovocitos 2 veces en medio TCM-199+HEPES, posteriormente se equilibraron por 3 min en el primer medio de vitrificación (TCM + 7.5 % de dimetilsulfoxido + 7.5 % de etilenglicol); seguidamente se expusieron al segundo medio de vitrificación (TCM + 16 % dimetilsulfoxido + 16 % etilenglicol + 0.4 M de sacarosa) por menos de un minuto; durante este último proceso los ovocitos se cargaron por capilaridad en el extremo del borde abierto adelgazado de una pajilla (OPS; Minitüb), e inmediatamente las pajillas se sumergieron en nitrógeno líquido. Para su almacenamiento líquido hasta su descongelación.

Descongelación

Los ovocitos se descongelaron usando el método descrito por Sanchez-Osorio *et al.* (2008) en donde las pajillas, después de sacarse del termo de nitrógeno, se sumergieron en una solución de TCM 199 + 10 % de suero fetal bovino (FCS) + 0.13 M de sacarosa por 5 min. Descongelados, se evaluaron morfológicamente y se consideró que los ovocitos fueron anormales cuando; tenían menos

de 2 capas de células del cúmulus (Ovocitos Grupo COC) o bien presentaban daños evidentes en la zona pelúcida o en citoplasma (picnosis y/o granulaciones; ovocitos COC y DND) (Yadav *et al.* 2008, Purohit *et al.* 2012). Posterior a esta evaluación, los ovocitos se sometieron a su maduración.

Maduración de los ovocitos

Los ovocitos descongelados de ambos grupos se lavaron tres veces en medio de MIV. Posteriormente se colocaron en gotas (25-30 ovocitos por gota) de 100 μ L de medio MIV, se cubrieron con aceite mineral y se incubaron por 24 h a temperatura de 38.5 °C, atmósfera de 5 % de CO₂ y humedad a saturación.

Al finalizar la maduración, un grupo de ovocitos de cada tratamiento (COC = 61; DND = 46) se fijaron y tiñeron para evaluar la tasa de maduración. Los ovocitos seleccionados se lavaron en PBSD y se situaron en microgotas del mismo medio en un portaobjetos, en el cual previamente se colocaron dos líneas paralelas de vaselina, y se cubrieron con cubreobjetos, presionando hasta contactar con las microgotas. Los ovocitos se fijaron en 25 % (v:v) de ácido acético en etanol, a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo de fijación (48-72 h) los ovocitos se tiñeron con 1 % de Lacmoid en 45 % (v:v) de ácido acético en agua purificada y se examinaron en un microscopio de contraste de fases. Se consideró como ovocitos maduros, sólo aquellos en donde se observó presencia de los cromosomas en Metafase II (MII) y la extrusión del cuerpo polar (Gil *et al.* 2003).

Fecundación *In vitro*

Después de la maduración, los ovocitos se lavaron 3 veces en medio de fecundación, y se colocaron en gotas de 90 μ L (25-30 ovocitos por gota), se cubrieron con aceite mineral y se colocaron en la incubadora (\pm 15 min) en espera de la adición de los espermatozoides. Éstos se obtuvieron de semen congelado (pajillas) de un toro que previamente fue probado para la FIV; el semen descongelado se colocó en un tubo Falco con 4 mL de medio fecundación y se centrifugó durante 5 min a 500 rpm; después de la centrifugación, se retiró el so-

brenadante, se colocaron nuevamente en 4 mL del mismo medio y se centrifugó otra vez durante 5 min a 500 rpm; se retiró el pellet de espermatozoides del fondo del tubo y se diluyó con medio TL en un microvial, se determinó la concentración y se ajustó a 1×10^6 espermatozoides en 1 mL de medio. A cada gota de FIV, se le agregó los espermatozoides en 10 μ L del medio y se procedió a la incubación durante 24 h, a temperatura de 38.5 °C, atmósfera de 5 % de CO₂ y humedad a saturación.

Al finalizar la fecundación, un grupo de ovocitos de cada tratamiento (COC = 39; DND = 40) se fijaron en 25 % (v:v) de ácido acético en etanol, a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo de fijación (48-72 h) los ovocitos se tiñeron con 1 % de Lacmoid en 45 % (v:v) de ácido acético en agua purificada y se examinaron en un microscopio de contraste de fases. Se consideraron como ovocitos penetrados o fecundados, cuando se observó en su interior los dos corpúsculos polares, el pronúcleo femenino, cabezas espermáticas descondensadas y/o pronúcleos masculinos, con sus correspondientes flagelos espermáticos (Maside *et al.* 2011).

Cultivo *In vitro* de Embriones (CIV)

Al finalizar la FIV, los presuntos cigotos de ambos grupos se sacaron de la incubadora y al grupo COC, mecánicamente con la ayuda de una micropipeta se les retiró el exceso de células de la cúmulus. Ambos grupos de ovocitos se lavaron tres veces en medio de cultivo de embriones (SOF) para eliminar completamente las células del cúmulus y espermatozoides restantes. Al finalizar el lavado, los ovocitos se colocaron en gotas de 90 μ L de medio SOF, se cubrieron con aceite mineral e incubaron por 48 h, a 38.5 °C, 5 % de CO₂ y humedad a saturación; al finalizar este tiempo, se evaluó la proporción de cigotos divididos, y se procedió a sustituir el 50 % del medio de cada gota por medio nuevo y se continuó con la incubación hasta el día 7. El medio de cultivo se reemplazó (50 %) cada 24 h.

Para control del proceso de producción de embriones *in vitro*, un grupo de ovocitos (n = 128) sin ningún tratamiento, fue sometido a MIV, FIV y CIV; al final, se reportan su diferentes proporciones

Tabla 1. Tasas de recuperación y de normalidad morfológica de los ovocitos bovinos vitrificados con (COC) y sin células del cúmulus (DND).

Table 1. Rates of recovery and morphological normality of bovine oocytes vitrified with cumulus cells (COC) and without cumulus cells (DND).

Grupo	Ovocitos vitrificados	Ovocitos recuperados	Ovocitos normales morfológicamente	Ovocitos anormales
COC	317	307 (96.8 %) ^a	307 (100 %) ^a	–
DND	279	269 (96.4 %) ^a	249 (92.5 %) ^b	20 (7.5 %)

^{ab} diferente literal entre filas difiere significativamente ($p < 0.05$)

sin la comparación estadística con los otros grupos.

Análisis estadístico

La proporción de ovocitos recuperados, morfológicamente normales después de la descongelación, maduros, fecundados y divididos por tratamiento (con o sin células del cúmulus), se analizó mediante Ji cuadrada, utilizando el programa Statgraphics Centurion XV (Statpoint, Inc. 2007); las diferencias se consideraron significativas al nivel de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se vitrificaron un total de 596 ovocitos (COC = 317; DND = 279), la tasa de recuperación post-descongelación fue similar entre los dos grupos ($p > 0.05$); Sin embargo, la proporción de ovocitos considerados morfológicamente normales fue mayor en el grupo COC ($p < 0.05$) con la diferencia del 7.5 % en comparación con el grupo DND (Tabla 1).

En cuanto a la proporción de ovocitos maduros y fecundados (Tabla 2), se puede observar que el porcentaje de ovocitos maduros fue similar para el grupo COC y el grupo DND ($p > 0.05$). En cuanto al porcentaje de ovocitos que se fecundaron después de la maduración, se observó que fue bajo (en promedio 12.6 %), aunque el porcentaje de ovocitos penetrados fue ligeramente mayor para los ovocitos del grupo DND que para el grupo COC, no se encontró diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$).

A las 48 h después de la fecundación se evaluó la cantidad de cigotos dividido, la proporción de división también fue bajo y fue similar para ambos grupos ($p > 0.05$), el promedio fue 2.6 % (Tabla

3). Ninguno de los ovocitos divididos alcanzó estadios de mórula o blastocito (Tabla 3). En el grupo control, la tasa de maduración fue 90 % y la de producción de embriones de 27.5 %.

DISCUSIÓN

En el presente estudio la vitrificación de los ovocitos con células de cúmulus aparentemente no afectó la viabilidad de éstos, ya que todos los ovocitos de este grupo (COC) que se descongelaron, se encontraban morfológicamente normales; a diferencia de ello, cuando los ovocitos fueron vitrificados sin las células del cúmulus, se observó un incremento de los ovocitos morfológicamente anormales ($p < 0.05$), esta situación es similar a la reportada por Purohit *et al.* (2012) quienes vitrificaron ovocitos de cabras y después de la descongelación, encontraron que la proporción de ovocitos morfológicamente normales fue significativamente más baja ($p < 0.05$) en el grupo que se vitrificó sin las células del cúmulus (89.22 %) en comparación con el grupo vitrificado con las células del cúmulus (94.12 %). Sin embargo, es diferente de lo reportado por Shirazi *et al.* (2012) quienes no reportan diferencia ($p > 0.05$) en la sobrevivencia a la descongelación entre los ovocitos ovinos vitrificados con (73 %) o sin (66 %) células del cúmulus.

Se reconoce que las células del cúmulus juegan un papel importante en los diferentes procesos fisiológicos del ovocito (Modina *et al.* 2004, Li *et al.* 2006) y pueden proveer protección a los ovocitos cuando éstos se someten a la crioconservación (Modina *et al.* 2004, Purohit *et al.* 2012). Sin embargo, pueden existir diferencias, dependiendo del tipo de estadio del ovocito, por ejemplo: se reporta

que la viabilidad postvitrificación es menor en los ovocitos vitrificados en metafase II que en vesícula germinal (Modina *et al.* 2004; Prentice *et al.*, 2011; Diez *et al.*, 2012; Purohit *et al.* 2012).

Tabla 2. Tasas de maduración y de fecundación de los ovocitos bovinos vitrificados con (COC) y sin células del cúmulus (DND).

Table 2. Rates of maturation and fertilisation of bovine oocytes vitrified with cumulus cells (COC) and without cumulus cells (DND).

Grupo	Maduros		Fecundados	
	n	(%)	n	(%)
COC	61	47.54	39	10.26
DND	46	47.83	40	15.0

Maduros: Ovocitos teñidos con Iacmoid que presentaban cromosomas en metafase II y extrusión del primer corpúsculo polar. Fecundados: Ovocitos teñidos con Iacmoid que en su interior tenían los dos corpúsculos polares, el pronúcleo femenino, cabezas espermáticas descondensadas y/o pronúcleos masculinos, con sus correspondientes flagelos espermáticos.

Tabla 3. Tasas de recuperación y de normalidad morfológica de los ovocitos bovinos vitrificados con (COC) y sin células del cúmulus (DND).

Table 3. Rates of division and embryos of bovine oocytes vitrified with cumulus cells (COC) and without cumulus cells (DND).

Grupo	N	Ovocitos divididos(%)	Embriones (%)
COC	207	2.90	0
DND	163	2.45	0
Control	128	90.10	27.5

Ovocitos divididos: ovocitos que a las 48 h post FIV presentaban 2 o más células blastoméricas en su interior; Embriones: Cigotos que alcanzaron el estadio de morula o blastocito 5 y 7 días después post FIV respectivamente.

La especie de que se trate, también puede ser un factor de influencia, Bogliolo *et al.* (2007) y Shirazi *et al.* (2012) señalan que las células del cúmulus no mejoran la sobrevivencia de los ovocitos ovinos criopreservados. En la especie equina, Tharasanit *et al.* (2009) encontraron que, cuando los ovocitos son vitrificados sin las células del cúmulus, la capacidad de desarrollo meiótico se reduce. En el presente trabajo la vitrificación de los ovocitos bovi-

nos con las células del cúmulus, fue benéfica, ya que la totalidad de los ovocitos descongelados fueron considerados morfológicamente normales, en comparación con los ovocitos vitrificados sin las células del cúmulus.

En el presente estudio se observó que los porcentajes de ovocitos maduros (47.59 % vs 47.83 %; $p > 0.05$) y de fecundación (10.26 % vs 15 %; $p > 0.05$) fueron similares tanto para el grupo COC como para el grupo DND. Los resultados de maduración son diferentes de lo reportado por Purohit *et al.* (2012) quienes encontraron diferencia en el porcentaje de maduración de los ovocitos de cabras vitrificados con y sin células del cúmulus, y reportan una tasa de 41.2 % de maduración para los ovocitos vitrificados con las células del cúmulus y 27.4 % para los vitrificados sin células del cúmulus ($p < 0.05$). En cuanto a las tasas de fecundación, los resultados del presente estudio son similares a los Purohit *et al.* (2012) quienes no encontraron diferencia en los porcentajes de fecundación entre los ovocitos vitrificados con o sin células del cúmulus (31.7 % vs 25 %; $p > 0.05$); sin embargo, sus valores de fecundación se encuentran por arriba de este estudio.

La criotolerancia de los ovocitos es compleja y depende de varios aspectos, entre los que se mencionan relación área:volumen (superficie), baja permeabilidad de la membrana plasmática al agua y/o los crioprotectores, así como la presencia o ausencia de las células del cúmulus (Diez *et al.* 2012, Purohit *et al.* 2012, Shirazi *et al.* 2012). En el presente estudio aunque el porcentaje de ovocitos morfológicamente normales fue alto para los grupos COC y DND (96 % en promedio), el porcentaje de maduración y de fecundación bajó de forma drástica. Esta situación posiblemente se debió a que, aunque en la evaluación morfológica la apariencia de los ovocitos era buena, probablemente la vitrificación les ocasionó algún daño citoplasmático. Se ha señalado que estructuras como los microtúbulos y microfilamentos de actina que desempeñan papeles importantes en el desarrollo cromosomal y citoplasmático del ovocito resultan dañados por la criopreservación (Modina *et al.*, 2004). Prentice *et al.* (2011) mencionan que uno de los principales componentes que se dañan durante la criopreser-

vación es el citoesqueleto, y esto puede afectar la tasa de maduración y fecundación de los ovocitos vitrificados. Por su parte Saragusty y Arav (2011) mencionan que la crioconservación ocasiona problemas en la segregación cromosomal durante la maduración *in vitro*, lo cual reduce la tasa de maduración. Esto probablemente explica la diferencia encontrada entre la alta proporción de los ovocitos morfológicamente normales y el bajo porcentaje de los ovocitos maduros y fecundados del presente estudio.

Diversos estudios reportan que la vitrificación por sí misma provoca daños en los ovocitos bovinos, resultando una pobre maduración nuclear y desarrollo embrionario (Prentice *et al.* 2011, Papis *et al.* 2014) y su efecto puede ser más evidente en el caso de los ovocitos denudados o inmaduros (Papis *et al.* 2013, Shirazi *et al.* 2014). Un aspecto importante, es que el proceso de crioconservación no causa la muerte inmediata a los ovocitos, reflejándose esto en tasas de división aceptables (34-59 %), pero con bajas tasas de desarrollo embrionario (Prentice *et al.* 2011) situación que pudo incidir en los resultados del presente trabajo, ya que los porcentajes de maduración de los ovocitos vitrificados fueron aceptables (47 % en promedio), sin embargo, las tasas de fecundación y de división fueron bajas y no hubo desarrollo embrionario.

Es probable que la baja tasa de división (COC: 2.9 % y DND 2.45 %) y la ausencia desarrollo

embrionario observada en el presente estudio, se deba al proceso de vitrificación, ya que en ambos grupos de ovocitos, la tasa de división fue baja y no hubo desarrollo embrionario posterior. Diferentes reportes indican que la crioconservación ocasiona daños al citoesqueleto, y esto puede afectar la tasa de maduración y fecundación de los ovocitos vitrificados (Prentice *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones del presente estudio, se observó que la vitrificación de ovocitos sin las células del cúmulus, disminuyó su calidad morfológica post-descongelación. La tasa de maduración fue similar entre los ovocitos vitrificados con y sin células del cúmulus. Las tasas de fecundación y de división fueron bajas en ambos grupos (COC y DND) y no se encontró desarrollo embrionario.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca de doctorado otorgada al primer autor, al Laboratorio Brasuca, S.A. de C.V., en especial al Ing. Manuel Suarez Romero por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto. Al Ing. José Luis Gerónimo Jiménez, por el apoyo técnico brindado.

LITERATURA CITADA

- Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C, Terqui M (2000) Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw method. *Cryobiology* 41: 116-124.
- Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, *et al.* (2007) Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology* 68: 1138-1149.
- Chian RC, Niwa K, Sirard MA (1994) Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 41: 1499-1508.
- Diez C, Duque P, Gómez E, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodríguez A, *et al.* (2005) Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology* 64: 317-333.
- Diez C, Muñoz M, Caamaño JN, Gómez E (2012) Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 76-83.
- Didion BA, Pomp D, Martin MJ, Homanics GE, Markert CL (1990) Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Journal of Animal Science* 68: 2803-2810.

- Fernandez-Reyes F, Ducolomb Y, Romo S, Casas E, Salazar Z, Betancourt M (2012) Viability, maturation and embryo development *in vitro* of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology* 64: 261-266.
- Fujihira T, Nagai H, Fukui Y (2005) Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of Taxol treatment for vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes *Cryobiology* 52: 339-343
- Gil MA, Abeydeera LR, Day BN, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA (2003) Effect of the volume of medium and number of oocytes during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology* 60: 767-776.
- Hyttel P, Vajta G, Callesen H (2000) Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. *Molecular Reproduction and Development*. 56: 80-88
- Kim SS, Olsen R, Kim DD, Albertini DF (2014) The impact of vitrification on immature oocyte cell cycle and cytoskeletal integrity in a rat model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31: 739-747
- Ledda S, Bogliolo L, Succu S, Ariu F, Bebbere D, Leoni GG, et al. (2007) Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. *Reproduction Fertility and Development* 19: 13-23.
- Lliteras ER, Chong M (2009) Avances en la criopreservación de ovocitos. *Ciencia y Tecnología Ganadera* 3: 1-13.
- Li GP, Bunch TD, White KL, Rickords L, Liu Y, Sessions BR (2006) Denuding and centrifugation of maturing bovine oocytes alters oocyte spindle integrity and the ability of cytoplasm to support parthenogenetic and nuclear transfer embryo development, *Molecular Reproduction and Development* 73: 446-451.
- Maside C, Gil MA, Cuello, C, Sanchez-Osorio J, Parrilla I, Lucas X, et al. (2011) Effects of hoechst 33342 staining and ultraviolet irradiation on the developmental competence *in vitro*-matured porcine oocytes. *Theriogenology* 76: 1667-1675.
- Modina S, Beretta M, Lodde V, Lauria A, Luciano AM (2004) Cytoplasmic changes and developmental competence of bovine oocytes cryopreserved without cumulus cells. *European Journal of Histochemistry* 48: 337-346.
- Mullen SF, Fahy GM (2012) A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs and sheeps. *Theriogenology* 78: 1709-1719.
- Papis K, Shimizu M, Saha S, Izaike Y, Modlinski JA, (2013) Effects of vitrification of partially denuded bovine immature oocytes. *Animal Science Papers and Reports* 31: 5-14.
- Pereira RM, Marques CC (2008) Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank* 9: 267-277.
- Prentice JR, Singh J, Dochi O, Aznar M (2011) Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology* 75: 602-609.
- Purohit GN, Meena H, Solanki K (2012) Effects of vitrification on immature and *in vitro* matured, denuded and cumulus compact goat oocytes and their subsequent fertilization. *Journal of Reproduction and Infertility* 13: 53-59.
- Sanchez-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. *Animal Reproduction Science* 108: 334-344.
- Santos P, Chaveiro A, Simões N, Moreira da Silva F (2008) Bovine oocyte quality in relation to ultrastructural characteristics of zona pellucida, polyspermic penetration and development competence. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 685-689.

- Saragusty J, Arav A (2011) Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141: 1-19
- Shirazi A, Taheri F, Nazari H, Norbakhsh-nia M, Ahmadi E, Heidari B (2014) Developmental competence of ovine oocyte following vitrification: Effect of oocyte developmental stage, cumulus cells, cytoskeleton stabilizer, FBS concentration, and equilibration time. *Zygote* 22: 165-173.
- Statgraphics, centurion XV (2006) Version 15.2.06. Statpoint, Inc. USA.
- Tharasanit T, Colleoni S, Galli C, Colenbrander B, Stout TA (2009) Protective effects of the cumulus-corona radiata complex during vitrification of horse oocytes. *Reproduction* 137: 391-401.
- Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR (1995) Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. *Biology of Reproduction* 53: 1385-1391
- Yadav RC, Sharma A, Garg N, Purohit GN (2008) Survival of vitrified water buffalo cumulus-oocyte complexes and their subsequent development *in vitro*. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 11: 55-64.
- Zhou XL, Al Naib A, 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.