



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Efecto de la temperatura y tiempo de transporte, sobre la
viabilidad de ovocitos caprinos vitrificados.**

TESIS

Que para obtener el título de

Médica Veterinaria y Zootecnista

PRESENTA:

Torres Resillas Sandra Paola

Asesor: M en C. Fátima Betsabé González Silvestry

Coasesor: Dr. Salvador Romo García

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto de la temperatura y tiempo de transporte, sobre la viabilidad de ovocitos caprinos vitrificados.

Que presenta la pasante: SANDRA PAOLA TORRES RESILLAS

Con número de cuenta: 30815554-3 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de abril de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Armando Enrique Esperón Sumano	
VOCAL	Dr. Miguel Ángel Pérez Razo	
SECRETARIO	M. en C. Fátima Betsabé González Silvestry	
1er. SUPLENTE	Dr. José Alfredo Medrano Hernández	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Diana Merino Lima	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm*

AGRADECIMIENTOS.

Al Doctor Salvador Romo García por aceptarme en el proyecto y a la Maestra Fatima B. González Silvestry por guiarme en la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Saraí, Froylan, Ramses y Laura, por ayudarme durante la fase experimental.

Al señor Víctor Carrillo, a su familia y a su personal que nos permitieron y facilitaron la obtención de ovarios caprinos en sus instalaciones.

A todos los miembros del jurado de tesis que con sus observaciones ayudaron a mejorar este trabajo.

A mi familia por apoyarme durante toda la carrera, a mis amigos y en especial a Diego Huanett por no permitir que me rindiera nunca.

También agradezco el apoyo recibido por parte de PAPIIT, con el proyecto IN222315 “Efecto de la vitrificación en la viabilidad, maduración y desarrollo embrionario en vitro de ovocitos inmaduros de caprino.”.

Contenido

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEORICO	8
2.1 Ciclo estral	8
2.2 Ovogénesis.....	10
2.3 Maduración del ovocito.....	11
2.3.1 Maduración citoplasmática.....	11
2.3.2. Maduración nuclear.....	11
2.4 Foliculogénesis.	12
2.5 Métodos de recolección de ovocitos.....	13
2.6 Evaluación morfológica de ovocitos.....	15
2.7 Técnicas de tinción para evaluar la viabilidad.	19
2.7.1 Metil Tiazolil Tetrazolio (MTT).....	19
2.7.2 Hoechst 33252.....	20
2.7.3 Azul de Tripán	20
2.7.4 Fluorocromo Diacetato de Fluoresceína (FDA).....	21
2.7.5 Resazurina.....	21
2.8 La criopreservación.....	22
2.9 Crioprotectores (CP).....	23
2.9.1 Etilenglicol.....	25
2.9.3 Propanadiol (PROH)	26
2.9.4 Trehalosa.....	26
2.10 Vitricación.	26
2.11 Calentamiento	27
3. OBJETIVO	29
4. METODOLOGÍA.....	30
4.1 Colección de ovarios.....	30
4.2 Obtención de ovocitos.....	30
4.3 Evaluación de ovocitos.....	31

4.4 Evaluación de viabilidad.	31
4.5 Vitricación de ovocitos.	32
4.6 Calentamiento de ovocitos.	32
4.7 Análisis estadístico.....	32
5. RESULTADOS.	33
5.1. Viabilidad pre vitricación (VPre).....	33
5.2. Viabilidad pos vitricación (VPos)	34
5.3. Comparación entre VPre y VPos.....	35
5.4 Calidad de ovocitos.....	36
6. DISCUSIÓN	38
7. CONCLUSIÓN.....	41
8. BIBLIOGRAFÍA.	42
Anexo 1 Diagrama de flujo metodología.....	50
Anexo 2. Preparación de medios.....	51

RESUMEN

El tiempo y la temperatura son dos de los factores claves que pueden ser perjudiciales para la calidad de los ovocitos, en términos de maduración nuclear y porcentajes de división posteriores a la fertilización *in vitro* (Arriaga *et al.*, 2014). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura y del tiempo de transporte de ovarios sobre la viabilidad de ovocitos caprinos antes y después de ser vitrificados. Se colectaron un total de 360 ovarios caprinos de rastro, de los cuales se obtuvieron 1426 ovocitos, los ovarios se dividieron en 4 grupos con diferentes temperaturas y tiempos de transporte: Grupo T1Ti1 (37-38 °C durante 2-4 horas), Grupo T1Ti2 (37-38 °C durante 4-6 horas), Grupo T2Ti1 (15-17 °C durante 2-4 horas) y Grupo T2Ti2 (15-17 °C durante 4-6 horas). Para cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones. Los ovarios fueron transportados hasta el laboratorio en solución salina fisiológica con penicilina/estreptomicina, al llegar se aspiraron los folículos utilizando la técnica de aspiración folicular. Se realizó la clasificación morfológica de acuerdo a la calidad de los ovocitos, la vitrificación se realizó por el método de Superficie Sólida Vitrificante (SSV). En cada grupo se evaluó la viabilidad pre-vitrificación (VPre) y post-vitrificación (VPos), utilizando la tinción MTT. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los diferentes tratamientos en cuanto a VPre, en promedio en el Grupo T1Ti1 se encontró un porcentaje de VPre del 65.64%, para el Grupo T2Ti1 de 74.88%, para el Grupo T1Ti2 de 76.26% y de 69.17% para el Grupo T2Ti2. Mientras que en VPos se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos T1Ti1 con 47.84% y T2Ti2 con 28.28%.

En cuanto a la calidad se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos sobre la calidad 1, obteniendo mayor cantidad de ovocitos calidad 1 en el grupo Ti1T1 (6.8%) con respecto al grupo Ti2T1 (2.8%) y con el grupo Ti2T2 (2.9%), sin embargo no hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$) con el grupo Ti1T2 (5.6 %).

Se concluye que la temperatura no es un factor determinante sobre la viabilidad ni la calidad de ovocitos caprinos obtenidos de ovarios de rastro, siempre y cuando dicha temperatura sea constante durante todo el transporte y la manipulación de los ovarios. Sin embargo, la viabilidad y calidad se ven afectadas por el factor tiempo, demostrando que, para poder conservar un buen nivel de viabilidad pre-vitrificación y post-vitrificación y al mismo tiempo mantener la calidad de ovocitos inmaduros, deberán transportarse los ovarios en el menor tiempo posible.

1. INTRODUCCIÓN

El ganado caprino se ha explotado para la producción de leche, carne y pieles; teniendo una relevancia productiva discreta mundial y nacional, comparada con otras especies ganaderas de rumiantes (Aguilar, 2007).

En 2014 México contaba con una población caprina de alrededor de 8, 687,814 cabezas, siendo los principales estados productores Puebla y Oaxaca, con el mayor número de cabezas: 1,219,910 y 1,252,122 respectivamente. Se produjeron a nivel nacional un total de 77,824 toneladas de ganado en pie con un valor de \$1,966,511 miles de pesos para ese año y 39,758 toneladas de carne en canal, con ganancias de \$2,031,665 miles de pesos. En lo que a leche se refiere se produjeron 155,497 toneladas y se ganaron \$781,668 miles de pesos (SIAP, 2014).

De la producción total de leche el 70 por ciento es producido en sistemas extensivos y el 30 por ciento en sistemas intensivos (CONARGEN, 2013).

La producción caprina en nuestro país representa una fuente de ingreso y de alimento para numerosas familias campesinas, esta actividad es cada vez más reconocida debido a la variedad de productos que se pueden aprovechar de esta especie, además por su facilidad de crianza con pocos recursos y por proveer proteína de alta calidad a bajo costo (CONARGEN,2013).

Las características climáticas de México hacen esta especie idónea para su explotación, debido a su capacidad de adaptarse a los territorios áridos y semiáridos (Aguilar, 2007).

En el ámbito reproductivo, en México predomina el apareamiento de monta libre, teniendo como consecuencias partos en épocas inoportunas y en el caso de aquellos productores que manejan empadres controlados y por tiempo limitado (dos o tres semanas) los índices reproductivos son de bajos a muy bajos. Los reportes para la fertilidad son menores de 90%, con rangos de 51%

a 85%. La prolificidad fluctúa de 1.2 a 1.7 cabritos por parto. En general las pérdidas son superiores al 15% en infertilidad (Aguilar, 2007).

En algunas regiones del país, principalmente en el estado de Guanajuato se sigue usando la monta controlada en una parte de los hatos, con dos épocas de empadre la primera de junio a agosto y la segunda de noviembre a enero, aunque en tiempos recientes se comienza a practicar la inseminación artificial (CONARGEN, 2013).

Las tecnologías de reproducción asistida (ART) como la inseminación artificial y transferencia de embriones, se utilizan para aumentar la eficiencia reproductiva y acelerar el mejoramiento genético, a través del acortamiento del diferencial de selección (Baldassarre, 2007).

Las ART adaptadas a la especie caprina han sido poco implementadas para planes de mejoramiento genético, debido a cuestiones de costo y eficiencia (Baldassarre, 2007).

Una de las mayores limitantes en la implementación de la fertilización *in vitro* en cualquier especie es el transporte de la célula reproductiva de la hembra, u ovocito, hasta los laboratorios con equipamiento y técnicos capacitados para realizar la fertilización. La calidad del ovocito es el factor de mayor peso en la producción de embriones por fertilización *in vitro* y en segundo lugar la susceptibilidad de los mismos a la criopreservación (Konrad *et al.*, 2013).

El tiempo y la temperatura son dos de los factores claves que pueden contribuir a causar efectos perjudiciales en la calidad del ovocito, en términos de maduración nuclear y rangos de división después de la fertilización *in vitro* (Arriaga *et al.*, 2014). Estos factores han sido evaluados en especies domésticas de mayor relevancia económica, como ganado bovino (Pérez, 1987; Matsushita *et al.*, 2004), alpacas (Arriaga *et al.*, 2014), equinos (Matsukawua *et al.*, 2007) y porcinos (Wongsrikeao *et al.*, 2005). A diferencia de estas especies, en cabras

no se han realizado los suficientes estudios en el ámbito reproductivo, a pesar de ser un animal de suma importancia en países en vía de desarrollo, de ahí la importancia de establecer una metodología que pueda ser utilizada como referencia en los avances de la biotecnología reproductiva caprina.

2. MARCO TEORICO

En otras especies domésticas se han logrado avances significativos en la biotecnología reproductiva, especialmente en la producción *in vitro* de embriones, sin embargo, las condiciones en que se realiza la colección y la maduración de ovocitos influyen en el éxito de la fertilización y en el grado de desarrollo que los embriones llegan a alcanzar (Pérez, 1987).

La recolección de ovarios permite recuperar y aprovechar folículos anovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos (Fernández *et al.*, 2010).

Una de las alternativas para la optimización de las técnicas de producción *in vitro* es el uso de ovarios de hembras enviadas al rastro como una fuente más económica para generar ovocitos maduros y embriones (Quintana *et al.*, 2012) Existen pocas diferencias entre los ovocitos obtenidos de hembras de rastro y los obtenidos *in vivo*, las ventajas de las donadoras vivas es el acceso a animales de calidad genética y que se pueden colectar en repetidas ocasiones (Hashimoto *et al.*, 1999).

2.1 Ciclo estral

Comprende una serie de eventos ováricos, endocrinos y conductuales con la finalidad de que ocurra la ovulación, el apareamiento y la gestación (Galina *et al.*, 2006).

Estos componentes son regulados por factores ambientales, genéticos, fisiológicos, hormonales y conductuales (Hafez y Hafez, 2000). Se divide en

dos etapas fase folicular (proestro y estro) y fase lútea (metaestro y diestro) (Galina *et al.*, 2006).

Proestro: durante esta etapa ocurre la regresión del cuerpo lúteo y disminuye la concentración de progesterona, aumenta la producción de estradiol e inhibina (Galina *et al.*, 2006).

La FSH se encuentra constante pero en baja concentración debido a que es regulada por el estradiol y la inhibina folicular. La creciente producción de estrógenos foliculares inicia la preparación del aparato reproductivo para el apareamiento y las glándulas endometriales entran en una fase proliferativa (Galina *et al.*, 2006).

Estro: es la etapa de receptividad sexual. En el ovario los folículos en desarrollo alcanzan su madurez y tamaño preovulatorio, se produce una elevada secreción de estrógenos a partir de estos folículos, posteriormente ocurre el pico de LH el cual es responsable de la ovulación (Galina *et al.*, 2006).

A nivel de útero los estrógenos estimulan cambios en el endometrio y la producción de prostaglandina E (Hafez y Hafez, 2000).

Los estrógenos son los responsables de la conducta sexual (Galina *et al.*, 2006). En los rumiantes el cerebro requiere una exposición previa a progesterona para sensibilizar a la acción del estradiol. Por lo que en el primer ciclo no hay manifestación de celo (Galina *et al.*, 2006).

Metaestro: comprende desde el momento en que termina la receptividad sexual hasta que hay un cuerpo lúteo funcional. Después de la ovulación ocurre la formación de cuerpo amarillo, con lo que inicia la secreción de progesterona (Hafez y Hafez, 2000).

El estradiol y la inhibina disminuyen después de la ovulación, permitiendo el incremento de FSH que causa el reclutamiento de la primera oleada folicular (Galina *et al.*, 2006).

Diestro: es la etapa más larga del ciclo estral, la progesterona alcanza las máxima concentraciones, inhibe la formación de receptores hipofisarios de

GnRH por tanto la liberación de LH y la secreción de GnRH. Se observan incrementos de FSH para el aumento en el desarrollo folicular y concentraciones de estradiol e inhibina que conllevan a la formación de las ondas foliculares, esta fase concluye con la destrucción del cuerpo lúteo por acción de la Prostaglandina F2 α (Galina *et al.*, 2006).

En la cabra este ciclo dura en promedio 21 días. El estro dura 12 a 73 horas, en promedio 24 horas y la ovulación ocurre de 30 a 36 horas después de iniciado el estro (Galina *et al.*, 2006).

La cabra es poliestrica estacional, inicia su ciclo estral en los periodos de fotoperiodo decreciente, es decir en otoño-invierno y permanece en anestro el resto del año (Galina *et al.*, 2006).

Anestro: es un periodo de inactividad reproductiva, hay actividad hormonal y desarrollo folicular pero no hay maduración folicular ni ovulación (Galina *et al.*, 2006).

2.2 Ovogénesis.

El desarrollo de los ovocitos comienza durante la etapa fetal, tiene su origen en unas células denominadas germinales primordiales (Rodríguez, 2013).

Después de la diferenciación se dividen por mitosis, en este momento se conocen como ovogonias, estas replican su ADN e inician la meiosis I. La célula detiene su meiosis después de pasar por la primera división meiótica y se convierte en ovocito primario (Rodríguez, 2013).

Los ovocitos de la mayoría de mamíferos se encuentran en estadio de diploteno de la profase I, al momento del nacimiento, hasta que se produce la adecuada estimulación de factores de crecimiento y hormonales generalmente durante la etapa de la pubertad, dando lugar a la progresión de estos ovocitos al estadio de metafase II (MII) liberando el primer cuerpo polar (Figura 1). Posteriormente,

éstos quedarán en este estadio de MII hasta que se produzca la fecundación (Cuadrado, 2012).

2.3 Maduración del ovocito.

2.3.1 Maduración citoplasmática.

La capacitación ovocitaria ocurre durante la foliculogénesis y representa un periodo de síntesis y almacenamiento de macromoléculas, también hay modificaciones bioquímicas y morfológicas que se desencadenan con el pico de LH, que conceden al ovocito la capacidad de mantener la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Cuadrado, 2012).

Las células de la granulosa producen ácido hialurónico que permite la expansión y mucificación de las células del cúmulo y la pérdida de las uniones tipo GAP (Cuadrado, 2012).

2.3.2. Maduración nuclear.

El ovocito adquiere la competencia meiótica que está asociada al factor promotor de maduración que se activa en ovocitos completamente desarrollados. La reanudación de la meiosis está regulada por diversas moléculas como quinasas reguladoras de la señal extracelular, adenosinmonofosfato cíclico y el factor promotor de maduración que le confieren la capacidad de romper la membrana nuclear y la progresión de la meiosis II. La cromatina se condensa, el nucleolo desaparece y se rompe la vesícula germinal (Cuadrado, 2012).

2.4 Foliculogénesis.

Cuando el ovocito está recién diferenciado se asocia con un grupo de células del estroma que se denominan células foliculares y dan lugar a los folículos primordiales (Rodríguez, 2013).

En el crecimiento folicular ocurre la proliferación y diferenciación de las células de la teca y la granulosa, lo que provoca un incremento en la capacidad de los folículos de formar estradiol y de reaccionar a gonadotropinas (Hafez y Hafez, 2000). Las células de la granulosa cambian de una forma plana a una forma cúbica e inicia el crecimiento y la maduración del ovocito (Galina *et al.*, 2006). La activación de los folículos primordiales se caracteriza por un cambio en la morfología de las células de la granulosa y se conectan con la superficie del ovocito a través de microvellosidades, lo que determina el inicio de la transformación de los folículos primordiales en primarios (Rodríguez, 2013).

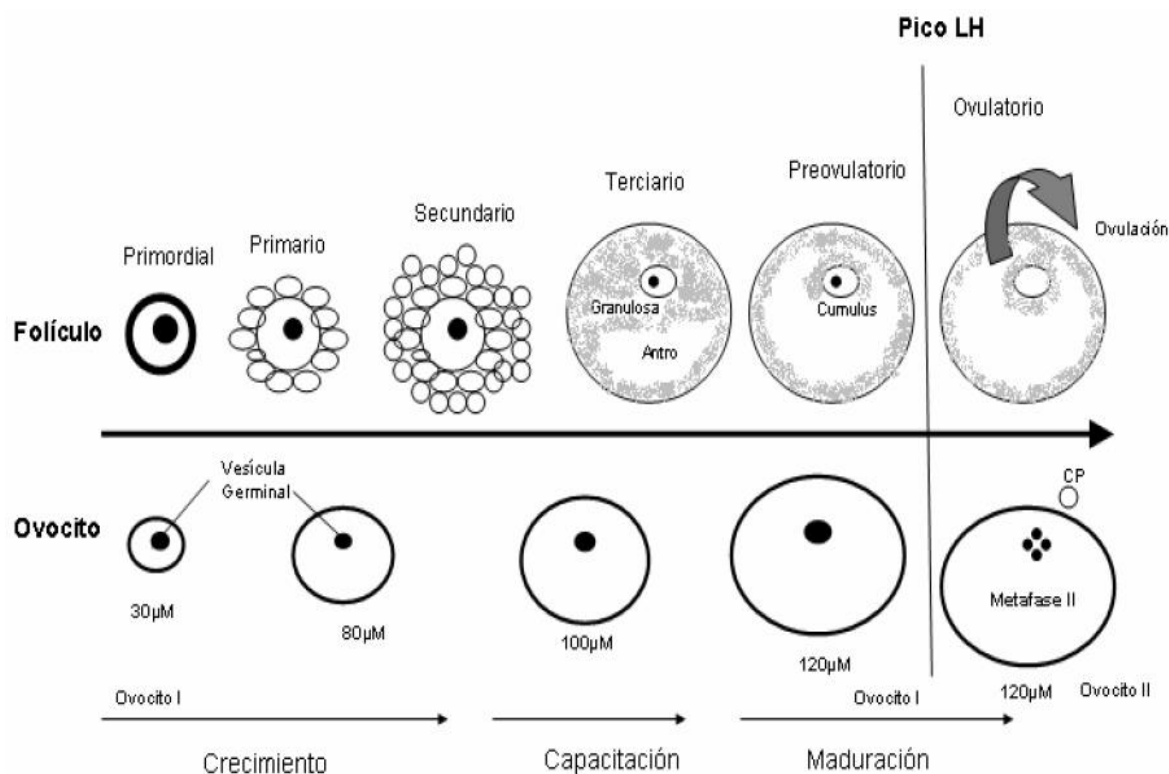


Figura 1. Crecimiento folicular y ovogénesis (Mermillod *et al.*, 1999)

Los receptores para FSH se expresan en células de la granulosa desde las primeras etapas foliculares, aceleran el crecimiento de folículos preantrales. Al avanzar el desarrollo folicular, los folículos se vuelven sensibles a las gonadotropinas y dependen de ello para su crecimiento (Galina *et al.*, 2006). En esta fase ocurre el reclutamiento, la selección y la dominancia del ovocito. Reclutamiento: un conjunto de folículos se desarrollan simultáneamente por estímulo de FSH. Los folículos inician la secreción de estradiol e inhibina. Selección: uno o varios folículos, según la especie, se convierten en dominantes y solo estos continúan su desarrollo (Galina *et al.*, 2006). Dominancia: el folículo dominante bloquea el soporte hormonal para el resto de los folículos, induciendo su atresia y reprimiendo el reclutamiento de una nueva oleada. Este folículo se mantiene gracias a la LH, pero requiere niveles basales de FSH. El aumento en LH concluye la maduración folicular y produce la ovulación (Galina *et al.*, 2006).

2.5 Métodos de recolección de ovocitos.

La recolección de ovocitos se puede realizar por medio de disección quirúrgica de folículos superficiales y la punción o aspiración folicular, este último método ha reportado menor cantidad de complejos cúmulo-ovocito (COC) pero se obtiene una mayor tasa de desarrollo en embriones producidos *in vitro* (Quintana *et al.*, 2012).

La disección quirúrgica se puede realizar por medio de cortes con navaja de bisturí en cada folículo observable, colectando el líquido folicular en una caja de Petri, con este método se obtiene mayor cantidad de COCs (Quintana *et al.*, 2012).

Estudios demuestran que mediante el corte del ovario se obtienen ovocitos de mejor calidad para la fecundación *in vitro*, así como un mayor número, (Hamano y Kuwayama, 1993). Por este mismo método se obtienen ovocitos de

folículos no superficiales, que en ocasiones no alcanzan el tamaño adecuado para la maduración (Arlotto *et al.*, 1996).

La punción folicular (Fotografía 1) se realiza con el uso de una jeringa sin émbolo de goma y con aguja hipodérmica del número 18, con este método los COC se exponen durante menor tiempo a condiciones ambientales, consume menos tiempo y es más práctico si se va a trabajar con una gran cantidad de ovarios (Quintana *et al.*, 2012).

Gonzales *et al* (2012), compararon ambos métodos demostrando más efectividad en la técnica de seccionamiento por obtener una mayor cantidad de ovocitos totales y más ovocitos de calidad 1 y 2 con este método, sin embargo Whitesell *et al.*, (1992) demostraron una mayor tasa de desarrollo de embriones producto de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos obtenidos por el método de punción folicular.



Fotografía 1. Técnica de aspiración folicular (Tomada en el laboratorio de Reproducción Animal FESC-C4).

La imagen muestra la punción folicular de un ovario caprino.

Pawse *et al.*, 1994 compararon los métodos de recolección de ovocitos, por aspiración, por corte y por punción ovárica. En dicho trabajo se concluyó que se obtienen un mayor número de ovocitos mediante el método de aspiración folicular y ovocitos de mayor calidad con el método de corte, sin embargo no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres tratamientos en cuanto a los porcentajes de maduración, fertilización y desarrollo embrionario.

2.6 Evaluación morfológica de ovocitos.

Los aspectos que se evalúan sobre la calidad del ovocito son: Estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cúmulo, así como el diámetro de los ovocitos, que condicionan su capacidad para madurar (Martínez, 2013). Se requiere el uso de tinciones y de técnicas especiales para poder evaluar el estado nuclear y la viabilidad.

Existen varias formas de clasificar la calidad de los ovocitos, la más aceptada es la que comprende cuatro calidades, basándose en las características del COC (De Loos *et al.*, 1989).

Calidad 1: cubierta celular múltiple y compacta, ovoplasma homogéneo y COC ligeramente transparente (Fotografía 2).

Calidad 2: cubierta celular múltiple y compacta, ovoplasma homogéneo pero con apariencia de una zona más oscura en la periferia del ovocito, COC ligeramente oscuro y menos transparente (Fotografía 3).

Calidad 3: cubierta celular poco compacta, ovoplasma irregular con agrupaciones oscuras COC más oscuro (Fotografía 4).

Categoría 4: cubierta celular expandida, hay células de cúmulo distribuidas en puntos oscuros con matriz gelatinosa, ovoplasma irregular con puntos o agrupaciones oscuras y COC oscuro e irregular (Fotografía 5).

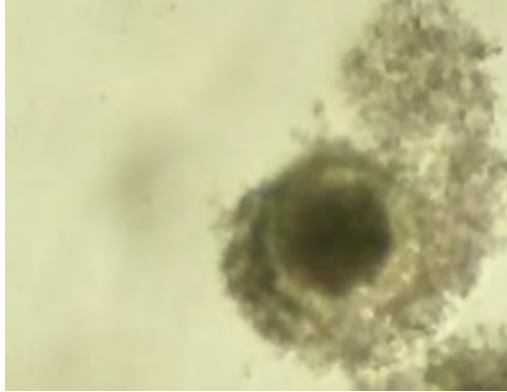
Otra clasificación, usada por Lonergan *et al.*, (1991) las describe de igual forma las categorías pero agrega número de capas quedando para el tipo A más de 4 capas y el tipo B de 1 a 3 capas.



Fotografía 2. Ovoci to de calidad 1.
(Tomada en el laboratorio de Reproducci3n Animal FESC-C4 a 40X).



Fotograf3a 3. Ovoci to de calidad 2.
(Tomada en el laboratorio de Reproducci3n Animal FESC-C4 a 40X).



Fotografía 4. Ovocito de calidad 3.

(Tomada en el laboratorio de Reproducción Animal FESC-C4 a 40X).



Fotografía 5. Ovocito de calidad 4.

(Tomada en el laboratorio de Reproducción Animal FESC-C4 a 40 X).

La clasificación basada en la morfología del cúmulo es la más adecuada ya que evalúa la competencia de los ovocitos, debido a que las células del cúmulo forman una asociación íntima con el ovocito por medio de proyecciones transzonales altamente especializadas que penetran a través de la zona pelúcida formando las uniones GAP, que nutren al ovocito hasta las últimas fases de su desarrollo (Rodríguez, 2013).

2.7 Técnicas de tinción para evaluar la viabilidad.

2.7.1 Metil Tiazolil Tetrazolio (MTT)

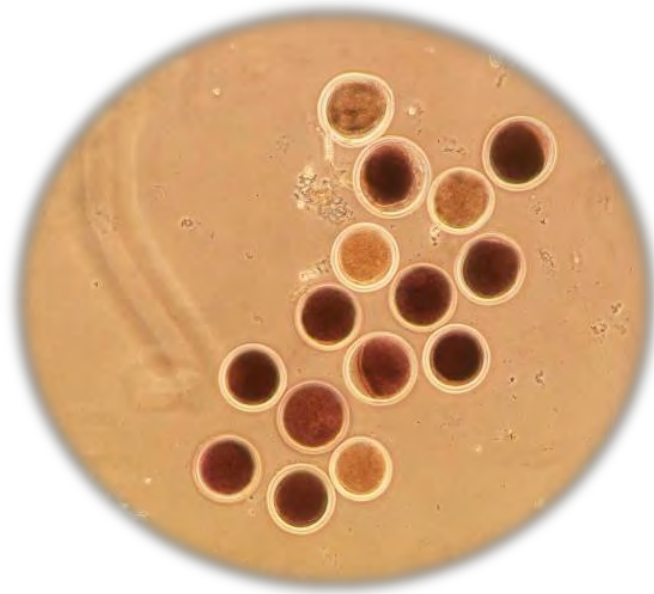
Para realizar la evaluación de viabilidad existen muchas técnicas que actúan de diferente forma, una de ellas mide la función metabólica de las células: la tinción de Bromuro de Metil Tiazolil Tetrazolio o MTT por sus siglas [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], que determina la actividad mitocondrial en células vivas y ha sido usada para medir la citotoxicidad (Mosmann, 1983). Basado en la reducción de sales de Tetrazolio las cuales forman formazán, que es un producto generado por la actividad deshidrogenasa en las células (Moo-Puc *et al.*, 2009), este es un compuesto insoluble que tiñe las células vivas (Nelson y Olsen, 1967). Las células teñidas de color rojo-rosa-azul se consideran como vivas o viables (Fotografía 7) y las células sin teñir como no viables (Etxeberria *et al.*, 2011).

Los cristales azul-violeta son producidos por componentes de la cadena respiratoria, fundamentalmente por la respiración y su flujo de electrones por lo cual son tóxicos para las células (Bernas y Dobrucki, 2002).

El MTT es captado por el proceso de endocitosis, al ser reducido por las mitocondrias forma una sal que es acumulada en los lisosomas y es transportada a la superficie celular por el proceso de exocitosis (Vendrell, 2006).

Dicho método fue desarrollado por Mosmann (1983) como método colorimétrico cuantitativo para la determinación de la supervivencia y

capacidad de proliferación de células mamíferas, es preciso y rápido (Escobar *et al.*, 2008).



Fotografía 7. Tinción MTT vista al microscopio en 40 aumentos (Tomada en el laboratorio de Reproducción Animal FESC-C4).

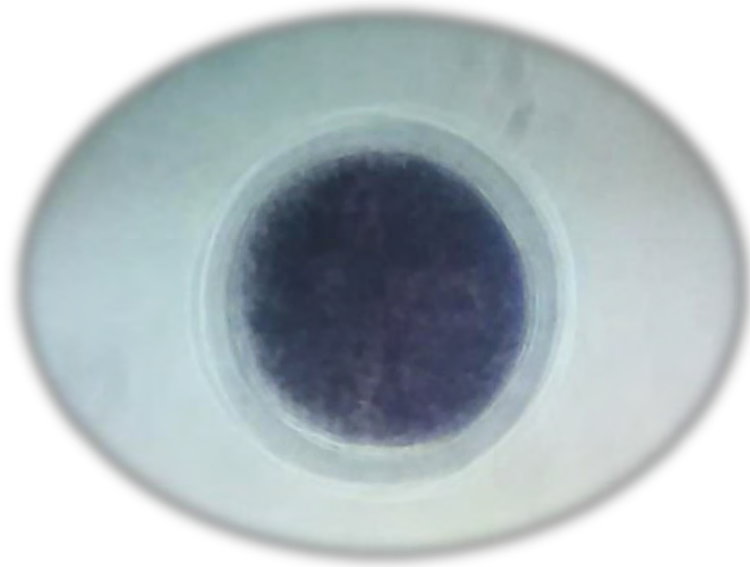
Los ovocitos que se observan de color morado se consideran como viables, mientras que los que tienen un tono amarillo son los no viables o muertos.

2.7.2 Hoechst 33252

Es un colorante fluorescente con afinidad por nucleótidos de adenina y timina. Esta tinción ha sido utilizada para identificar núcleos apoptóticos, que presentan reducción de tamaño, fragmentación de ADN y mayor intensidad de la tinción (Vendrell, 2006).

2.7.3 Azul de Tripán

Es una tinción supravital que permite diferenciar los ovocitos muertos de los vivos, mediante la coloración azul en las células muertas (Filipiak y Larocca, 2012) (Fotografía 8). Se basa en que el colorante no puede pasar al interior de las células con pared citoplasmática intacta (Rejón *et al.*, 2010).



Fotografía 8. Tinción azul de Tripán vista al microscopio en 40 aumentos (Tomada en el laboratorio de Reproducción Animal FESC-C4).

En la imagen se observa un ovocito con coloración azul lo que quiere decir que es inviable

2.7.4 Fluorocromo Diacetato de Fluoresceína (FDA).

Evalúa la integridad de la membrana celular, se requiere un microscopio de fluorescencia en el que se observan las células vivas con una fluorescencia verde (Cuadrado, 2012).

El FDA entra a la célula y es hidrolizado por la esterasa a fluoresceína (Boender, 1984). Es un éster apolar, lo que le permite su paso a través de la membrana hidrofóbica de la célula viva. Una vez dentro, el éster es hidrolizado por enzimas esterases, dejando libre la fluoresceína, fluorocromo que cuando se excita con una longitud de onda adecuada (490 nm) emite fluorescencia de color verde brillante en las células vivas (Rejón *et al.*, 2010), al combinarse con Ioduro de Propidio las células no viables se tiñen de rojo.

2.7.5 Resazurina.

Es un colorante poco tóxico y permite continuar estudiando las mismas células. La Resazurina es reducida a resofurina, que se observa rosado fluorescente, por oxireductasas en la mitocondria de células viables (Escobar *et al.*, 2008). Son

leídas a una longitud de onda de excitación 535 nm y 595 nm de emisión en un lector TECAN (Escobar *et al.*, 2008).

2.8 La criopreservación.

En los últimos años la criotecnología ha avanzado enormemente tanto en el área de la medicina reproductiva humana como en la reproducción animal. La criopreservación tiene como principio básico la reducción de la temperatura como forma de reducir el metabolismo celular, permitiendo que las células o tejidos sean conservados por periodos indeterminados (Viera *et al.*, 2011).

La criopreservación de ovocitos tiene una gran importancia en la preservación y manejo de recursos genéticos, reduce los costos en el intercambio internacional de genética seleccionada y una rápida diseminación de germoplasma a través de la producción de embriones, la ingeniería genética, así como procedimientos de transferencia (Gupta *et al.*, 2007).

El proceso de criopreservación puede ser realizado por los métodos de congelación lenta, congelación rápida, congelación ultra rápida y la vitrificación.

En la congelación lenta la adición de crioprotectores suele hacerse por pasos y el descenso de temperatura se realiza lentamente, con el objetivo de controlar la velocidad de enfriamiento para que a medida que desciende la temperatura ocurra la penetración del crioprotector (CP) al interior de la célula, produciendo un equilibrio osmótico y reduciendo la producción de hielo intracelular (Báez y Villamediana, 2008).

En la congelación rápida se usan soluciones con altas concentraciones de CP y azúcares, en estas soluciones las células toleran la inmersión directa dentro del nitrógeno líquido.

Sin importar el método en la criopreservación las células pasan por cinco etapas fundamentales:

- 1) Exposición a agentes crioprotectores (ACP) con la finalidad de permitir la difusión de estos dentro de la célula.
- 2) Reducción de temperatura de forma gradual para el método de congelación lenta y de forma súbita en la vitrificación.
- 3) Almacenamiento.
- 4) Calentamiento, etapa en la que ocurre el rescate del material criopreservado restableciendo el metabolismo celular.
- 5) Remoción de ACP con el fin de evitar la formación de metabolitos secundarios (Viera *et al.*, 2011).

Las bajas temperaturas y la no formación de hielo dentro de la célula son los factores más importantes para la supervivencia de esta.

En especial la criopreservación de ovocitos representa un gran reto debido a la sensibilidad de su estructura.

Los cambios de osmolaridad y de temperatura durante la congelación y descongelación pueden provocar desorganización del citoesqueleto, anomalías cromosómicas, desintegración del huso, exocitosis prematura de gránulos corticales, endurecimiento de la zona pelúcida y desintegración de la membrana plasmática (Báez y Villamediana, 2008).

2.9 Crioprotectores (CP).

Independientemente del método de congelación que se elija es fundamental la utilización de un agente CP, para que las células sometidas a este proceso puedan resistir, sin embargo también confieren cierta toxicidad por lo cual buscar el CP ideal resulta una tarea difícil.

El tipo de CP usado, sus posibles combinaciones y su concentración son variables del proceso de vitrificación, que influyen directamente sobre la viabilidad celular (Giraldo *et al.*, 2012).

Los CP se clasifican, por su acción, en intracelulares o permeables y extracelulares o no permeables.

Los primeros son solventes orgánicos de bajo peso molecular capaces de entrar al interior de la célula (Rall *et al.*, 1984), forman cadenas de hidrógeno con las moléculas de agua e impiden la cristalización de hielo, también tienen el efecto de proteger a la célula de los efectos de la solución y mantienen en dilución a los electrolitos, reducen el cambio de volumen y el tiempo de exposición para completar el equilibrio osmótico de los ovocitos. Sin embargo a altas concentraciones o prolongada exposición producen daño excesivo de la membrana y reducen potencialmente el desarrollo embrionario posterior (Fernández *et al.*, 2012). En este grupo destacan el etilenglicol, el dimetilsulfoxido, propilenglicol y el propanadiol por tener una buena penetración y baja toxicidad.

De forma general actúan sustituyendo el agua en el interior de la célula mediante las siguientes acciones:

- Disminución del punto de congelación de la solución.
- Evitar la formación de cristales de hielo en el interior celular.

Los CP extracelulares reducen el agua intracelular por efecto osmótico, estos a su vez se dividen en dos grupos (Izaguirre, 2012):

-Alto peso molecular: en este grupo se encuentran polímeros como el polivinilalcohol, polietilenglicol, ficoll y la polivinil pirrolidona.

-Bajo peso molecular: conformado por mono y disacáridos como la sucrosa, trehalosa, glucosa y galactosa.

Las medidas que se toman para reducir los efectos tóxicos de los CP sobre la célula son: uso de CP de baja toxicidad y alta permeabilidad, utilización de dos a tres CP y adición de los CP en soluciones de concentración ascendente.

El uso de combinaciones de CP extracelulares e intracelulares ha favorecido el mejoramiento en la preservación de células germinales y embriones de varias especies dado que permite el aumento de la velocidad de enfriamiento, así como la disminución de los efectos osmóticos y tóxicos, y las alteraciones a nivel celular (Gómez *et al.*, 2010).

2.9.1 Etilenglicol

O monoetilenglicol es un alcohol con fórmula molecular $C_2H_4(OH)_2$ obtenido a partir de la hidrólisis de óxido de eteno (Viera *et al.*, 2011). Dentro de la célula es metabolizado en el retículo endoplásmico (Sumner *et al.*, 1999) donde se convierte en glicolaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y en menor medida por el citocromo P4502E1 (Viera *et al.*, 2011).

Debido a sus características de bajo peso molecular (62.07 g / mol) y bajo punto de fusión (-15,6 °C) se ha empleado ampliamente como agente crioprotector intracelular. La toxicidad no parece ser un factor limitante para el uso del Etilenglicol (EG) como crioprotector, ya que los estudios muestran altos niveles de supervivencia de las células, folículos caprinos y bovinos, ovocitos humanos y embriones de oveja. La alta permeabilidad del EG justifica su uso en la criopreservación de ovocitos maduros (Viera *et al.*, 2011).

2.9.2 Dimetilsulfoxido (DMSO)

Es un alcohol dipolar con fórmula química C_2H_6SO , en medicina se ocupa como antiinflamatorio, inmunomodulador, antimicrobiano, vasodilatador y antioxidante (Viera *et al.*, 2011).

Se ha usado como CP en semen, ovocitos y embriones. Es capaz de integrarse a diversas estructuras como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, sin causar alteraciones irreversibles en las moléculas. Es considerado un CP no tóxico, debido a que no produce alteraciones cromosómicas (Viera *et al.*, 2011).

Sin embargo se obtienen mejores resultados en cuanto a tasas de maduración de ovocitos si se usa en combinación con otros agentes, principalmente etilenglicol (Viera *et al.*, 2011).

2.9.3 Propanadiol (PROH)

Éste compuesto con fórmula química $C_3H_8O_2$ se caracteriza por su bajo peso molecular, alta permeabilidad en la membrana celular y por ser un compuesto biodegradable (Viera *et al.*, 2011).

Sus efectos han sido poco estudiados, en cuanto al área de la farmacología los efectos adversos descritos incluyen la producción de lactato intracelular, ocasionando desequilibrio ácido-base y consecuente muerte celular. Ha mostrado ser menos eficiente comparado con Etilenglicol y DMSO (Viera *et al.*, 2011).

2.9.4 Trehalosa

Es un disacárido de estructura molecular (O- α -D-glucopiranosil-(1 ϕ 1)- α -D-glucopiranososa), es utilizado como conservador de alimentos y participa en numerosas relaciones celulares. Tiene las mejores propiedades biofísicas y bioquímicas como osmoprotector (Clegg, 1985) ya que actúa como protector de proteínas y juega un papel importante en la estabilización estructural y funcional de la membrana celular (Virgilio *et al.*, 1994).

Ha mostrado ser un buen CP de proteínas y enzimas termolábiles, células y tejidos, actúa captando las moléculas de agua en la superficie celular (CONACYT, 2016).

2.10 Vitrificación.

La vitrificación es una tecnología que ha superado a la congelación tradicional en la criopreservación de ovocitos, mejorando el promedio de supervivencia por descongelamiento y de desarrollo embrionario *in vitro* en muchas especies domésticas (Ruiz *et al.*, 2011).

La vitrificación consiste en la reducción de la temperatura de forma abrupta, con el objetivo de transformar un sólido amorfo en un estado vítreo, que reduce la formación de cristales de hielo en el interior de las estructuras celulares (Viera *et al.*, 2011). Se basa en el contacto directo de células con nitrógeno líquido, suspendidas en una solución de vitrificación que contiene ACP en altas concentraciones (Gómez *et al.*, 2010).

El nitrógeno líquido confiere a las células la temperatura conocida como criogénica, en la cual las reacciones químicas, los procesos biológicos, las actividades intra y extracelulares están suspendidas, por lo cual se pueden conservar indefinidamente bajo estas condiciones (Sheikhi *et al.*, 2011).

La vitrificación en condiciones de campo reduce el equipamiento necesario y ofrece ahorro de tiempo y costos considerables por embrión transferido (Van *et al.*, 1997).

Esta técnica tiene ventajas como la eliminación de la formación de hielo y la disminución del daño causado por el enfriamiento, así como la disminución del tiempo de exposición a los CP. Por otro lado las consecuencias adversas son que incrementan las probabilidades de lesionar las células por un choque osmótico y por la toxicidad de los CP (Izaguirre, 2012).

La vitrificación se puede realizar con una gran variedad de dispositivos como las pajillas abiertas, pajillas cerradas, crioviales, rejillas de cobre, pajilla abierta estirada, cryoloop, cryotop, fibreplug y microgotas (Izaguirre, 2012).

2.11 Calentamiento

El término correcto para referirse a este proceso es calentamiento, ya que la palabra desvitrificación hace referencia a la formación de cristales de hielo, lo que indica un mal proceso. Este proceso es de gran importancia ya que si no se toman las medidas y procesamiento adecuados el trabajo puede venirse abajo. (Izaguirre, 2012).

Este proceso generalmente se realiza en etapas, en las que el objetivo es eliminar las altas concentraciones de CP gradualmente.

El material a calentar se somete a soluciones decrecientes de CP no permeables, para que por efecto osmótico salgan los CP intracelulares (Izaguirre, 2012).

3. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes temperaturas y tiempo de transporte de ovarios sobre la viabilidad de ovocitos caprinos vitrificados.

3.1 Objetivos particulares.

- Evaluar el efecto de diferentes temperaturas y tiempo de transporte de ovarios sobre la calidad de ovocitos caprinos frescos.
- Evaluar la viabilidad de ovocitos caprinos antes y después de la vitrificación.

4. METODOLOGÍA.

(Anexo 1)

4.1 Colección de ovarios.

Se colectaron ovarios de cabras de rastro, en Capulhuac, Estado de México. Los caprinos sacrificados en este domicilio particular, provienen de los estados de Aguascalientes, San Luis Potosí, Jalisco, Guanajuato y Zacatecas. Las hembras varían en características como tipo racial, edad y estado reproductivo.

Los ovarios colectados se separaron en cuatro grupos homogéneamente, para ser sometidos a diferentes condiciones de transporte.

Grupo T1Ti1: se transportó a temperatura de 37-38 °C por 2-4 horas.

Grupo T2Ti1: se transportó a temperatura de 15-17 °C por 2-4 horas.

Grupo T1Ti2: se transportó a temperatura de 37-38 °C por 4-6 horas

Grupo T2Ti2: se transportó a una temperatura de 15-17 °C por 4-6 horas.

Se trasladaron al laboratorio de Fertilización *In Vitro*, ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, en solución salina fisiológica (SSF) con 50 UI/ml de Penicilina/Estreptomicina y al llegar se lavaron con solución salina fisiológica.

4.2 Obtención de ovocitos.

Se eligió el método de aspiración folicular para recuperar los ovocitos, usando una charola de plástico en la que los ovarios eran secados, se utilizó jeringa sin goma de hule en el émbolo y aguja hipodérmica calibre 18 para aspirar el líquido folicular de todos los folículos, sin importar el tamaño, para obtener un mayor número de ovocitos.

En total se obtuvieron una cantidad de 360 ovarios caprinos, de los que se aspiraron 1426 ovocitos, en 10 repeticiones.

4.3 Evaluación de ovocitos.

El líquido folicular se pasó a cajas de Petri grandes, se lavó con TL-HEPES y se evaluaron en un microscopio estereoscópico con un aumento de 40X y se clasificaron morfológicamente en 4 categorías basándose en las características del COC (De Loos *et al*, 1989), descritas anteriormente.

Después de su evaluación se pasaron a una caja de Petri de cuatro pozos en medio base (MB) que contenía TCM-199 suplementado con TL-HEPES con 20% suero fetal bovino (SFB), para posteriormente vitrificarlos.

4.4 Evaluación de viabilidad.

De cada grupo se tomaron 10 ovocitos al azar, que fueron denudados en el Vortex durante un minuto y medio a una velocidad máxima en un microtubo eppendorf con 50µl de TL-HEPES.

Se depositó el contenido del microtubo en una caja de Petri chica y se enjuagó el microtubo con TL-HEPES para recuperar los ovocitos.

Se evaluó la viabilidad usando la prueba de MTT, se preparó una solución 0.005g (0.5mg) de MTT (tinción de bromuro de tetrazolio, azul tiazolil de SIGMA) / ml de PBS (Teteltila, 2014).

Una vez recuperados los ovocitos se colocaron en una caja de cuatro pozos con 300 µl de tinción MTT y se mantuvieron en la incubadora a 38°C y 5% de CO² por dos horas.

Después de este tiempo se hizo la evaluación, los ovocitos se observaron en un microscopio invertido con un aumento de 40X. Aquellos que mostraron color púrpura o azul se tomaron como vivos y los que no se colorearon como muertos. Se contaron el total de los ovocitos recuperados y los resultados se expresaron en porcentajes.

4.5 Vitrificación de ovocitos.

El resto de los ovocitos que se mantuvieron en MB fueron suspendidos en una gota de medio de equilibrio compuesto por MB con 4% de EG a 34°C de 12 a 15 min, después los ovocitos se pasaron por dos gotas de medio de vitrificación (35% de EG ,5% polivinil pirrolidona, 0.4M de trehalosa en MB) en un tiempo total de 25 a 30 segundos (Begin *et al.*, 2003) (Anexo 2).

Los ovocitos se tomaron con pipeta de vidrio modificada, en gotas de 1 a 2 μ l para su vitrificación y fueron depositados sobre una superficie limpia y seca de papel aluminio que flotaba en nitrógeno líquido (NL₂).

Las microgotas obtenidas se colectaron y se pasaron a un criotubo que se mantuvo en un termo de NL₂ a -196 °C durante una semana.

4.6 Calentamiento de ovocitos.

El proceso de calentamiento se realizó a 37°C, las gotas vitrificadas se colocaron en una solución de MB y 0.3 M de Trehalosa durante 3 min.

Posteriormente se sumergieron en 2 gotas diferentes que contenían concentraciones decrecientes de Trehalosa a 0.25 M y 0.125 M sucesivamente, a 37°C, durante 3 min cada uno. Se lavaron los ovocitos con medio LH-HEPES adicionado con 10% de SFB sin Trehalosa.

La evaluación de viabilidad post-vitrificación se realizó de la misma manera que se describió anteriormente para la evaluación pre-vitrificación.

4.7 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se expresaron en porcentajes y se transformaron a números arcoseno para poder utilizar un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el paquete estadístico SPSS con el cual se analizaron tanto viabilidad pre-vitrificación como viabilidad post-vitrificación. Este mismo análisis se usó para

evaluar los datos de calidad de ovocitos, considerando como diferencia estadística los casos en que $p < 0.05$.

5. RESULTADOS.

En este trabajo se evaluó el efecto de tiempo y temperatura del transporte de ovarios caprinos sobre la viabilidad de ovocitos frescos y no se encontró interacción ($p > 0.05$) sobre la viabilidad pre-vitrificación (Cuadro 1) de los ovocitos. Sin embargo, después de la vitrificación se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la viabilidad pos-vitrificación de los Grupos 1 y 4 (Cuadro 2).

Después del proceso de vitrificación en los Grupos 2, 3 y 4 hubo una reducción significativa ($p > 0.05$) de ovocitos viables, y el grupo que se encontró menos afectado fue el Grupo 1, ya que no hubo una pérdida significativa de la viabilidad (Cuadro 3 y Gráfico 1).

5.1. Viabilidad pre vitrificación (VPre)

El Cuadro 1 muestra las medias de los cuatro grupos de VPre, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los cuatro grupos.

Cuadro 1. Porcentajes de viabilidad pre-vitrificación y medias de grupos

Grupo	Temperatura de transporte (°C)	Tiempo de transporte (Hrs)	Porcentaje de viabilidad
T1Ti1	37-38	2-4	65.64
T2Ti1	15-17	2-4	74.88
T1Ti2	37-38	4-6	76.26
T2Ti2	15-17	4-6	69.17

5.2. Viabilidad pos vitrificación (VPos)

En el Cuadro 2 se muestran las medias por grupo de la viabilidad VPos.

Cuadro 2. Porcentajes de Viabilidad pos-vitrificación y medias de grupos.

Grupo	Temperatura de transporte (°C)	Tiempo de transporte (Hrs)	Porcentajes de viabilidad
T1Ti1	37-38	2-4	47.84 a
T2Ti1	15-17	2-4	31.13 ab
T1Ti2	37-38	4-6	35.99 ab
T2Ti2	15-17	4-6	28.28 b

a,b literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

5.3. Comparación entre VPre y VPos.

El Cuadro 3 muestra las medias obtenidas de viabilidad pre y pos de los cuatro grupos, y la diferencia o disminución que se obtuvo después de la vitrificación.

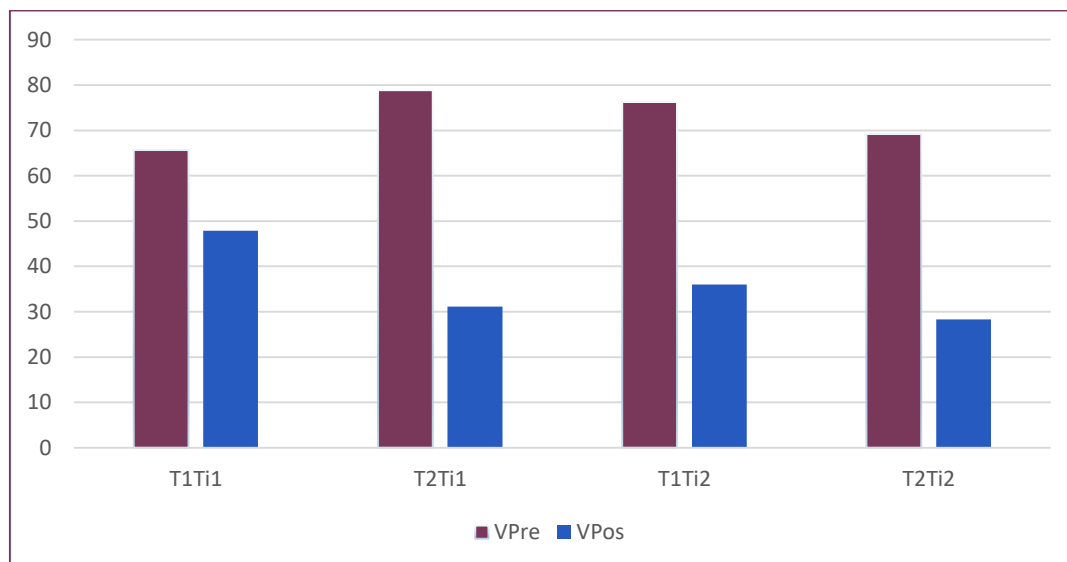
Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los grupos T1T2, T2T1 y T2T2.

Cuadro 3. Prueba t. Comparación entre VPre y VPos.

Grupo	Temperatura de transporte (°C)	Tiempo de transporte (Hrs)	VPre	VPos	Diferencias entre VPre y Vpos.	Valor P
T1Ti1	37-38	2-4	65.64	47.84	17.8	0.2066
T2Ti1	15-17	2-4	78.88	31.13	57.75	0.0002
T1Ti2	37-38	4-6	76.26	35.99	46.26	0.0099
T2Ti2	15-17	4-6	69.17	28.28	50.5	0.0027

El Gráfico 1 ilustra la disminución de la viabilidad que obtuvo cada grupo después del proceso de vitrificación.

Gráfico 1. Comparación VPre y VPos.



5.4 Calidad de ovocitos.

En el Cuadro 4 se puede observar el promedio por grupo, del número de ovocitos obtenidos de cada calidad y la desviación estándar por grupo.

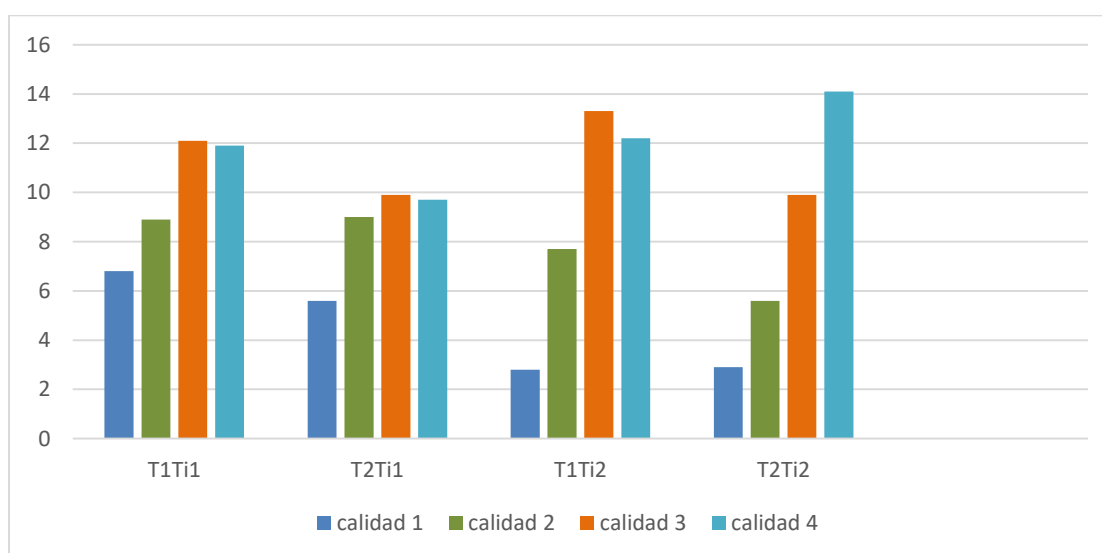
Cuadro 4. Porcentaje de calidad de ovocitos caprinos.

Grupo	Calidad 1	Calidad 2	Calidad 3	Calidad 4
1(T1Ti1)	6.8±0.95 a	8.9±1.19	12.1+1.55	11.9+2.53
2(T2Ti1)	5.6±0.95 ac	9.0±1.19	9.9 + 1.55	9.7+2.53
3(T1Ti2)	2.8±0.95 b	7.7±1.19	13.3+1.55	12.2+2.53
4(T2Ti2)	2.9±0.95 bc	5.6±1.19	9.9+1.55	14.1+2.53

a,b,c literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

El Gráfico 2 muestra los promedios de ovocitos por grupo, obtenidos de cada calidad.

Gráfico 2. Calidad de ovocitos obtenida.



En el análisis de calidad se observó una mayor cantidad de ovocitos de calidad 1 en el grupo transportado por 2 horas a 37°C (Media 6.8) y una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a los grupos 3 (4hrs, 37°C) y 4 (4hrs, 15°C), lo que sugiere que el tiempo tiene un efecto negativo sobre la calidad de ovocitos caprinos (cuadro 4). Sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos utilizados, sobre los ovocitos de calidades 2, 3 y 4.

Se puede observar que el Grupo 1 obtuvo mejores resultados dado que el porcentaje de ovocitos de calidad 1 obtenidos fue el más alto de los 4 grupos con un promedio de 6.8 ovocitos por ovario y el porcentaje más alto de ovocitos de calidad 2 con 8.9, manteniéndose así el Grupo 1 con un mejor aprovechamiento de las células obtenidas (Grafico 2).

Sin embargo, en dichos resultados no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) con el Grupo 2, lo que significa que no importa el efecto de la temperatura de 15-17°C o de 37- 38°C siempre y cuando los ovocitos se transporten en el menor tiempo posible y a una temperatura constante.

6. DISCUSIÓN

Existen pocos reportes del efecto de la temperatura y del tiempo de transporte sobre la calidad de ovocitos recuperados de ovarios de rastro, especialmente en pequeños rumiantes.

Matsushita *et al.*, (2004) en ovocitos bovinos observó que al mantenerlos a 10°C durante 24 h obtuvieron tasas de maduración y división de blastocitos con porcentajes del 68 y 25% respectivamente, conforme avanzó el tiempo de almacenamiento dicha maduración decreció hasta el 27%. En el 2011 Wang *et al.*, llegó a la conclusión que una temperatura de almacenamiento de 15 °C por 3-4 h tuvo un efecto beneficioso significativo en la calidad de los ovocitos bovinos. Pérez, en 1987 evaluó el efecto de la temperatura durante el transporte en ovocitos bovinos, utilizando dos rangos de temperatura de 22 a 25°C y 35 a 37°C, en el cual los resultados indican que la temperatura no repercute en la cantidad de ovocitos obtenidos de las cuatro calidades, pero si en la maduración *in vitro*. Comparado con este trabajo la calidad no se ve afectada por la temperatura y no se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo 1 transportado a 37-38°C y el grupo 2 transportado a 15-17°C.

Arriaga *et al.*, en el 2014 trabajando con alpacas evaluaron el efecto de la temperatura en su experimento, los ovocitos fueron almacenados de 12-15°C manteniendo su viabilidad y permitiendo tasas de maduración (12.2%), división (8.1%) y obtención de blastocitos (14.2 %).

Otros autores (Scherthaner *et al.*, 1997; Preis *et al.*, 2004; Matsukawa *et al.*, 2007, García *et al.*, 2011) recomiendan el manejo de ovocitos a temperatura ambiente en la mayoría de las especies, ya que no tiene efectos adversos y ayuda a conservar la viabilidad, además que mantiene la capacidad del ovocito para fecundar y reduce la dificultad de mantener la temperatura constante durante el transporte en ovocitos frescos. En el estudio actual se observó que en el grupo de ovocitos transportados a una temperatura de 15-17°C durante 4 horas no se

vio afectada la viabilidad en los ovocitos frescos, coincidiendo con los resultados de los autores anteriores, sin embargo si se vio afectada la viabilidad después de la vitrificación, por lo cual hay un menor número de ovocitos viables o vivos después de dicho proceso de vitrificación y calentamiento.

En algunos estudios relacionados, se ha encontrado que el almacenamiento de ovarios a 37-39°C durante 5-8 h disminuye la velocidad de maduración folicular de los ovocitos bovinos y el potencial de convertirse en blastocitos después de la fertilización *in vitro* (Yang *et al.*, 1990).

En cambio, el almacenamiento de los ovarios de bovinos a 20°C (Abe y Shioya, 1996) o 25°C (Yang *et al.*, 1990) durante 8 horas no reduce la velocidad de maduración o el potencial de los ovocitos bovinos para desarrollarse en blastocistos después de ser fertilizados *in vitro*.

El presente estudio examinó los efectos de transportar ovarios caprinos a 2 diferentes temperaturas durante 2 tiempos diferentes, evaluando la viabilidad pre y pos vitrificación, se mostró que las condiciones de temperatura durante el transporte no afectaron la viabilidad, sin embargo no se obtuvieron datos de maduración, o desarrollo *in vitro* de embriones.

Sierra en el 2015, evaluó la cantidad total de ovocitos viables al recolectar ovocitos bovinos de rastro a una temperatura de 38°C en diferentes periodos de tiempo que variaban de 1 a 9 h postmortem, observando una influencia negativa del tiempo en el porcentaje de viabilidad de los ovocitos, donde el mayor porcentaje de ovocitos viables se obtuvo a 1 y 3 h post mortem, con un valor de 68.7 % y 62.8 % de viabilidad, siendo los mejores momentos estadísticamente. Sin embargo ellos pudieron obtener ovocitos viables aún transcurridas 9 h después del sacrificio del animal manteniendo los ovarios a 38°C con un porcentaje de viabilidad de 51.5%, resultados que son similares a los del presente trabajo con un 65.64% (T1Ti1) y 74.88% (T2Ti1) para los grupos

transportados por dos horas y un 76.26% (T1Ti2) y 69.17% (T2Ti2) para los grupos transportados por cuatro horas.

Konrad *et al.*, en el 2013 realizaron un estudio en el que evaluaron los eventos tempranos de la FIV post-fertilización de ovocitos madurados *in vitro* durante el transporte, y demostraron que es viable realizar la maduración *in vitro* durante el transporte sin afectar significativamente la calidad y la maduración nuclear de los ovocitos de búfalo y bovino.

Los resultados de este trabajo mostraron que el tiempo ejerce un efecto negativo en la Calidad 1 de los ovocitos, mientras más largo sea el tiempo de transporte más cambios degenerativos sufre la célula. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Matsushita *et al.*, en el 2004 en el que se evaluaron el efecto del tiempo de almacenamiento de ovarios y observaron un aumento en la cantidad de ovocitos degenerados en los grupos que permanecieron almacenados por 48 y 72 h, sin embargo no observaron diferencia con el grupo almacenado por solo 24 horas. En ese trabajo los ovocitos comenzaron a sufrir dichos cambios a partir de las 4 horas de almacenamiento.

Fernández *et al.*, en el 2012, evaluaron la viabilidad de ovocitos porcinos inmaduros y madurados *in vitro* y vitrificados en Etilenglicol y Trehalosa, con ovarios transportados a temperatura ambiente de entre 25-30°C, obteniendo porcentajes de viabilidad del 100% en ovocitos inmaduros frescos y de 76% al momento del calentamiento. En comparación con este trabajo se obtuvo mayor viabilidad de ovocitos inmaduros frescos al momento del calentamiento en el grupo en el que fueron transportados a temperatura de 37-38°C por dos horas, con porcentajes de viabilidad de 65.64% pre-vitrificación contra un 47.84% pos-vitrificación.

En la literatura consultada no se encontraron referencias sobre el efecto del tiempo y la temperatura sobre la viabilidad de ovocitos en la especie caprina.

7. CONCLUSIÓN

Con este trabajo se concluye que la temperatura no es un factor determinante sobre la viabilidad ni la calidad de ovocitos caprinos obtenidos de ovarios de rastro, siempre y cuando este factor se mantenga constante durante el transporte y manipulación. Sin embargo, la viabilidad y la calidad se ven afectadas por el factor tiempo, demostrando que, para poder conservar un buen nivel de viabilidad pre-vitrificación y post-vitrificación y al mismo tiempo mantener la calidad de ovocitos inmaduros, deberán de transportarse los ovarios en el menor tiempo posible.

Hubo un mayor porcentaje de viabilidad en los ovocitos frescos recién colectados y después de la vitrificación al momento de ser calentados, la viabilidad disminuye significativamente después de la vitrificación.

Se sugiere continuar los estudios para comprobar el efecto de la temperatura y del tiempo de transporte sobre parámetros como maduración, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abe S, Shioya Y. 1996. Effects of temperature and duration of preservation of bovine ovaries in physiological saline the development of bovine embryos derived from follicular oocytes matured and fertilized in vitro. *Animal Science Technology Japan* 67: 633-838.
2. Aguilar E. 2007. Cátedra de reproducción y genética en ovinos y caprinos “Enfermedades reproductivas en hembras caprinas”. Servicio Social. FES Cuautitlán, UNAM. 1pp.
3. Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried ML. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45:943-956.
4. Arriaga I, Huanca W, Terreros M, Becerra J, García P, Ampuero B. 2014. Efecto de temperatura y tiempo de almacenamiento de ovarios de Alpacas sobre la tasa de maduración y división *in vitro* de ovocitos. *Revista de Investigación Veterinaria*. Perú. 25.4:477-486.
5. Báez F, Villamediana P. 2008. Desarrollo sostenible de ganadería de doble propósito. *Criopreservación ovocitaria*. 729-735.
6. Baldassarre H. 2007. Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Brazilian Reproduction Animal*. Belo Horizonte.31.2:274-286.
7. Begin I, Bathia B, Baldassarre H, Dynnes A, Keefer CL. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2 to 4 cell embryo using cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*.59:1839-1850.
8. Bernas T, Dobrucki J. 2002. Mitochondrial a Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1 and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes. *Cytometry*.47.4:236-242.

9. Boender J. 1984. Fluorescein-diacetate, a fluorescent dye compound stain for rapid evaluation of the viability of mammalian oocytes prior to *in vitro* studies, *Veterinary Quarterly*.6.4:236-240.
10. Carney E. 1999. Ethylene glycol developmental toxicity: unraveling the roles of glycolic acid and metabolic acidosis. *Toxicological sciences*.50:117-126.
11. Clegg JS. 1985. The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents: "the water replacement hypothesis". In: *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. AC Leopold. Cornell University.169-187.
12. CONACYT. Ciencia y desarrollo. Recuperado el 13 de noviembre del 2016, de <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/229/Articulos/Trehalosa/Trehalosa6.html>
13. CONARGEN. Censo ganadero, asociación de caprinocultores mexicanos. Recuperado el 16 de julio del 2016, de <http://www.conargen.mx/index.php/asociaciones/caprinos>
14. Cuadrado SF. 2012. Evaluación de ovocitos ovinos por microcopía de luz polarizada. Universidad de Oviedo. España. 8.
15. De Loos F, Vlient C, Maurik P, Kruip AM. 1989. Morphology of immature bovine oocyte. *Gamete Research*. 24.2:197-204.
16. Escobar ML, Rivera A, Aristabal GF. 2008. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Revista. Facultad de química farmacéutica*. 17.1:67-74.
17. Etxeberria A, Mendarte S, Larregla S. 2011. Determination of viability of *Phytophthora capsici* oospores with the tetrazolium bromide staining test versus a plasmolysis method. *Revista Iberoamericana de micología*. 28:43-49.

18. Fernández R, Ducolomb Y, Romo S, Casas E, Salazar Z, Betancourt. 2012. Efecto de la vitrificación en la viabilidad, maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos inmaduros de porcino y ovino vitrificados en diferentes recipientes. *Cryobiology*.64:261-266.
19. Fernández Reyes F, Hernández, Reyes FM. 2010. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos, *Revista Salud Animal*.32.2: 78-83.
20. Fernández Reyes, Hernández PJ, Castellanos GG. 2012. Viabilidad de ovocitos porcinos inmaduros y madurados *in vitro* vitrificados con etilenglicol y trehalosa. *Revista Salud Animal*. V.34., N.1:46-52.
21. Filipiak Y, Larocca C. 2012. Utilización de azul tripán para diferenciar ovocitos bovinos vivos y muertos en fertilización *in vitro*. *Archivos de Zootecnia*.61:309-312.
22. Galina C. 2006. Reproducción de los animales domésticos. Segunda edición. Ed. Limusa. México.
23. García AO, Maroto MA, Berlinguer F, Fernández SM, Estes MC, Mermillod P, Ortiz JA. 2011. Effect of storage temperature during transport of ovaries on *in vitro* embryo production in Iberian red deer (*Cervuselaphus hispanicus*). *Theriogenology*.75: 65-72.
24. Giraldo GJ, Gómez OJ, Vásquez AN. 2012. Efecto de la Dimetilformamida sobre la viabilidad post vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Revista Lasallista de investigación*.9.1:13-20.
25. Gómez OJ, Restrepo BG, Vázquez AN. 2010. Efecto del etilenglicol sobre la morfología post-desvitrificación de oocitos bovinos inmaduros, *Revista Lasallista de Investigaciones*.7.1:42-48.
26. Gonzales R, Soto BE, Delgado N, Portillo G, De Ondiz A, Velarde JC. 2012. Comparación de dos métodos de recolección de oocitos de ovario de bovinos mestizos sacrificados. *Revista Científica*.2.2:11-13.

27. Gupta MK, Uhm JS, Lee HT. 2007. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology*.67:238-248.
28. Hafez B, Hafez E. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. McGraw Hill Interamericana. México.
29. Hamano S, Kuwayama M. 1993. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of the individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*.39:703-712.
30. Hashimoto S, Takaruna R, Kishi M, Sudo T, Minami N, Yamada M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology*.51:757-765.
31. Izaguirre E. 2012. Adaptación de un método de vitrificación /calentamiento en *fibreplug* para la transferencia directa de blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Master universitario en biología y tecnología de la reproducción. Universidad de Oviedo. España. 5-36.
32. Konrad JL, Scian R, Garrido M, Taminelli G, Sansinena M. 2013. Producción de embriones de búfalo por fertilización *in vitro* luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado. *Revista Veterinaria*. 24.2:97-101.
33. Lonergan P, Vergos E, Kinis A, Sharif H, Gordon I. 1991. The effect of recovery method on the type of bovine oocytes obtained for IVM. *Theriogenology*.35:231-243.
34. Martínez MY. 2013. Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a fecundación *in vitro*. Universidad de Oviedo. España. 6-32.
35. Matsukawa K, Akagi S, Adachi N, Sato F, Hasegawa T, Takahashi S. 2007. *In vitro* development of equine oocytes from preserved ovaries after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction and Development*.53.4:877-885.

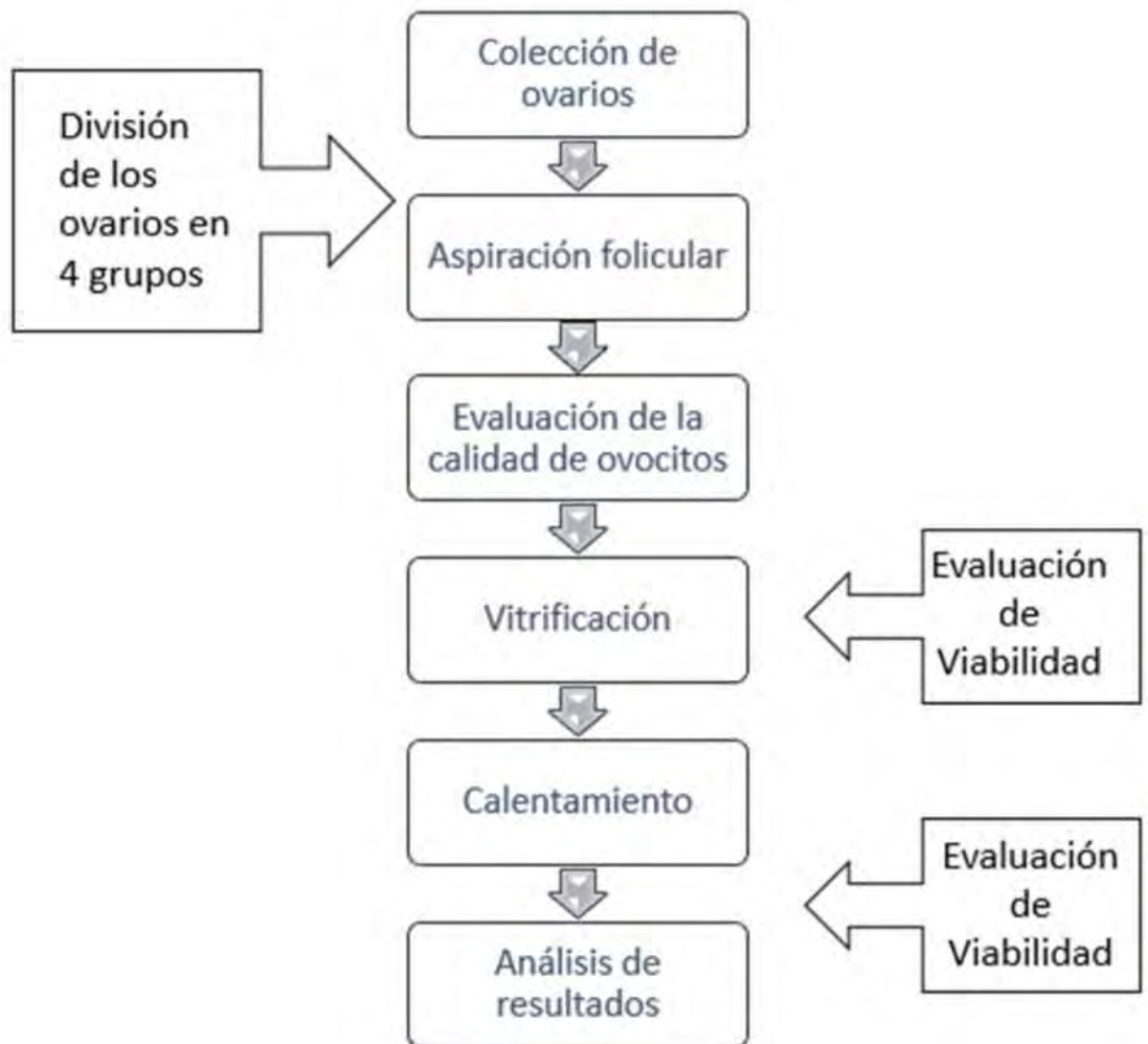
36. Matsushita S, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Animal Reproduction Science*.84:293-301.
37. McMartin KE, Wallace KB. 2005. Calcium oxalate monohydrate, a metabolite of ethylene glycol, is toxic for rat renal mitochondrial function. *Toxicological Science*. 84:195-200.
38. Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal Reproduction Fertil Suppl*. 54:449-60.
39. Moo-Puc R, Robledo D, Freile-Pelegrín Y. 2009. Actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* de macroalgas marinas de Yucatán, México., *Ciencias Marinas*.35.4:345-358.
40. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological. Methods*.16:55-63.
41. Nelson GA, Olsen OA. 1967. Staining reactions of resting sporangia of *Synchytrium endobioticum* with a tetrazolium compound. *Phytopathol*.57:965-968.
42. Pawse CH, Totey SM, Jain SK. 1994. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*.42:117-125.
43. Pérez MA. 1987. Efecto de temperatura de transporte de ovarios, desde el rastro hasta el laboratorio, en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. Tesis de licenciatura FMVZ. UNAM.3-37.
44. Preis KA, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Caracciolo di Brienza V, Gomes GM, Maclellan LJ, Squires EL. 2004. *In vitro* maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22 °C. *Theriogenology*.61:1215–1223

45. Quintana D, Campos P, Herrera P, Gallego C, Padrón E. 2012. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización *in vitro* FIV obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Revista Salud Animal*.34.1:53-56.
46. Rall WF, Reid DS, Polge C. 1984. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. *Cryobiology*.V.21:106-121.
47. Rejón JD, Suárez CG, Alché JD, Castro AJ, Rodríguez JM. 2010. Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*olea europea l.*). Universidad de Salamanca, España. *Polen*. 20:61-72.
48. Rodríguez ZL. 2013. Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación *in vitro*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 41-131.
49. Ruiz J, Landeo J, Artica F, Ratto F, Correa J. 2011. Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración *in vitro*. *Rev Int Vet. Peru*.22.3:206-2012.
50. Schernthaner W, Schmoll F, Brem G, Schellander K. 1997. Storing bovine ovaries for 24 hours between 15 and 21 C does not influence *in vitro* production of blastocysts. *Theriogenology*.47: 297.
51. Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B, Lundqvist M, Hovatta O. 2011. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Human Reproduction*.V.26.N.3:594-603
52. SIAP, Producción Ganadera.2014. Recuperado el 20 de julio de 2016, de <http://www.gob.mx/siap/>
53. Sierra BD. 2015. Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal

- de Tulcán. Tesis de grado. Facultad de Industrias Agropecuarias y ciencias ambientales. Universidad Politécnica de Carchi. Ecuador.
54. Sumner SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI. 1999. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chemical Research Toxicology*.12:1110-1116.
55. Teteltitla SM, 2014. Evaluación de la viabilidad, maduración y efecto genotóxico en ovocitos y células del cúmulo porcinos expuestos a sulfonato de perfluorooctano (pfos) *in vitro*. Tesis Maestría. UAM-Iztapalapa.
56. Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*.60:1110-1116.
57. Van W AM, den Daas JHG, Rall WF. 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: Vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*.60:357-364.
58. Viera CS, Carvalho A, Gomes C, Rocha L, Figueiredo J, Ribeiro A. 2011. Agentes crioprotectores Intracelulares: Características y utilización en la criopreservación de tejido ovárico y ovocitos, *Acta Scientiae Veterinariae*.39.2:1-12.
59. Virgilio CD, Hottiger J, Boller y Wiemken. 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem*.219: 179-186.
60. Vendrell MI. 2006. Evaluación y desarrollo de modelos *in vitro* para la predicción de neurotoxicidad. Aproximación proteómica a la neurotoxicidad inducida por metilmercurio. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.51-82.
61. Wang YS, Zhao X, Su JM, An ZX., Xiong XR, Wang LJ., Liu J. 2011. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science*.124: 48-54.

62. Whitesell DR, Hill KG, Miller DR, Jones AL, Wilson JM. 1992. *In vitro* embryo production from oocytes recovered from excised of terminal ill cow. *Theriogenology*. 322.
63. Wongsrikeao P, Otoi T, Karja NW, Agung B, Nii M, Nagai T. 2005. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. *Journal Reproduction Development*. 51.1:87.97.
64. Yang NS, Lu KH, Gordon I. 1990. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*.33:352.

Anexo 1 Diagrama de flujo metodología.



Anexo 2. Preparación de medios.

Todos los medios deberán permanecer con un pH dentro de un rango de 7.2 – 7.4 y una Osmolaridad de 270 – 285 mOsm/L. al menos que se indique lo contrario.

MEDIO BASE (MB)

	p/10 ml	p/20ml
TCM 199 H	9 ml	16 ml
SFB (Suero Fetal Bovino) = 10%	1 ml	2 ml
BSA (Albúmina Sérica Bovina Fracción V libre de ácidos grasos)*4%	0.04 g.	0.08 g.

*El Medio Base utiliza SFB o en su caso puede ser sustituido con BSA, ya que ambos proveen fuente energética, proteica y como factor surfactante. Y a su vez el BSA funciona como una sustancia quelante.

SOLUCIÓN DE EQUILIBRIO (SE)

	p/10 ml
Etilén Glicol (EG) 4%	0.4 ml.
MB	9.6 ml.

SOLUCIÓN VITRIFICANTE (SV)

	p/10 ml
Etilén Glicol (EG) 35%	3.5 ml
Polivinil Pirrolidona 5%	0.5 ml
Trehalosa 0.4 Molar	1.5133 gr.
MB	4.48 ml.

SOLUCIONES DE CALENTAMIENTO (SC)

Se realizan 3 soluciones de calentamiento utilizando el MB antes descrito y agregando Trehalosa en concentraciones decrecientes.

SC 1	MB + 0.3 Molar
SC 2	MB + 0.2 Molar
SC 3	MB + 0.1 Molar
SC 4	MB S/Trehalosa