

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE VENADO COLA
BLANCA (*Odocoileus virginianus*) VITRIFICADOS CON TREHALOSA O
SUCROSA**

POR:

M. V. Z. VERÓNICA ALEJANDRA RUBIO SANTILLANES

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

ÁREA MAYOR: REPRODUCCIÓN ANIMAL

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

DICIEMBRE DE 2019



Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) vitrificados con trehalosa o sucrosa. Tesis presentada por Verónica Alejandra Rubio Santillanes como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias, ha sido aprobado y aceptada por:

Ph. D. Carlos Ortega Ochoa
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

D. Ph. Agustín Corral Luna
Secretario de Investigación y Posgrado

Ph. D. Iván Adrián García Galicia
Coordinador Académico

M. C. Javier Antillón Ruiz
Presidente

14 de Diciembre de 2019.

Fecha

Comité:
Ph. D. Salvador Romo García
Ph. D. Felipe Alonso Rodríguez
Almeida
M. C. Juan Carlos Ontiveros
Chacón

© Derechos Reservados
AUTOR. VERÓNICA ALEJANDRA
RUBIO SANTILLANES
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO
FRANCISCO R. ALMADA KM.
1, CHIHUAHUA, CHIH.,
MÉXICO C.P. 31453
DICIEMBRE 2019

AGRADECIMIENTOS

Considero que no hay espacio suficiente para abarcar a todos los que formaron parte de este proceso con gran apoyo, amistad, paciencia y conocimientos aportados, sin embargo, por siempre agradezco enormemente a TODOS las personas que tuve el enorme gusto de conocer y mantener el intercambio de conocimientos para esta investigación.

A CONACYT por haberme otorgado una beca, la que me permitió realizar esta investigación, para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

A la Universidad Autónoma de Chihuahua por permitirme realizar mis estudios de Maestría correspondientes a Reproducción Animal.

A M.C. Javier Antillón por su extrema paciencia, apoyo, dirección e innumerables lecciones durante el proceso de investigación con perseverancia.

A Dr. Salvador Romo, una vez más, tuve la oportunidad de formar parte de su equipo lleno de nuevas aventuras, conocimientos, paciencia infinita, oportunidades y lecciones sin límites; Espero que no termine, siempre hay más. Sin duda, a M.C. Fátima González Silvestry junto a el Laboratorio de Reproducción de FESC- UNAM su hospitalidad, tiempo y paciencia.

A Dr. Michael Kjelland, por su paciencia, conocimiento y lecciones, demostrarme que las ideas si se pueden traer a la tierra y no existen los limites.

A los Laboratorios de UAM Xochimilco y FESC- UNAM por brindarme el apoyo necesario durante esta investigación, a mis compañeros, sin duda a Dr. José Luis Rodríguez Suástegui y Dr. José Ernesto Hernández Pichardo.

A Ing. Abelardo Sánchez, Rancho “San Vicente” de la Familia Treviño y Dr. Guadalupe Ávila por contribuir con el donativo de semen de VCB.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a toda mi familia, mis padres y hermana, motor de base, siempre presentes con apoyo incondicional, cuando el mundo cree que estoy loca, ustedes también pero me apoyan. Mis tíos, padrinos, primos y sobrinos pieza incondicional en este proceso, siempre pendientes. A mis nobles amistades presentes durante el proceso. De corazón, agradezco su apoyo e impulso para la realización de la presente investigación.

CURRICULUM VITAE

El autor nació el 4 de julio de 1992 en la Ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México.

- | | |
|-----------|--|
| 2011-2016 | Estudiante graduado de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia en el Instituto Tecnológico de Sonora |
| 2016-2017 | Médico Veterinario en Rancho cinegético “La Casita” en Mazatán, Sonora. |
| 2017-2019 | Estudios de Maestría en Ciencias en la Universidad Autónoma de Chihuahua con área mayor en Reproducción y Genética |

RESUMEN

MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS DE VENADO COLA BLANCA (ODOCOILEUS VIRGINIANUS) VITRIFICADOS CON TREHALOSA O SUCROSA

POR:

M.V. Z. VERÓNICA ALEJANDRA RUBIO SANTILLANES

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Presidente: M.C. Javier Antillón Ruiz

La producción de embriones *in vitro* de venado cola blanca (VCB) no está bien documentada. El objetivo del presente estudio fue realizar la maduración (MIV) y fertilización *in vitro* (FIV) utilizando ovocitos de VCB vitrificados con Trehalosa (TH) o Sacarosa (SC). Los ovocitos se vitrificaron en dos grupos: 1) TH (n = 60) y 2) SC (n = 61). Los ovocitos fueron desvitrificados (CO), después se evaluó la viabilidad en TH (n=5) y SC (n=5) y el estado nuclear (EN) en TH (n=4) y SC (n=5) clasificándolos en Vesícula Germinal (VG), Metafase I y No evaluable (NE). Se llevó a cabo la MIV durante 36 h en TCM-199 suplementado y se evaluaron los ovocitos madurados (n=88) para EN [VG, MI=inmaduro, MII=maduro]. Para la FIV se usó semen congelado con una concentración de 3×10^6 espermatozoides/ml, y la incubación fue por 24 h en medio TALP suplementado. En ésta etapa, el EN se registró como fertilizado (F), no fertilizado (NF) o NE. Para el análisis estadístico se corrió una prueba exacta de Fisher, $\alpha=0.05$. Para el grupo TH (n=5), después de la desvitrificación, se obtuvo una

viabilidad de 60 %, mientras que para la SC (n=5) la viabilidad fue 40 %. Todos los ovocitos se encontraban inmaduros. En la etapa de MIV, para el grupo TH (n=38) no se observó maduración y para el grupo SC (n=50) solo un 2 % de los ovocitos maduraron. En la etapa de FIV, con TH (n=10) no se presentó fertilización mientras que con SC (n=5) se logró 20 % de fertilización. Sin embargo, no se encontró diferencia ($P>0.05$) entre los grupos TH y SC. Debido al reducido número de muestra es necesario una evaluación adicional de TH y SC para vitrificación de ovocitos VCB para su uso con técnicas de PIV como modelo para otras especies de cérvidos en peligro de extinción.

ABSTRACT

IN VITRO MATURATION AND FERTILIZATION IN WHITE-TAILED DEER (*ODOCOILEUS VIRGINIANUS*) OOCYTES VITRIFIED WITH TREHALOSE OR SUCROSE

By:

M.V. Z. VERÓNICA ALEJANDRA RUBIO SANTILLANES

In vitro embryo production of white-tailed deer (VCB) is not well documented. The objective of this study was to conduct maturation (IVM) and in vitro fertilization (IVF) using VCB oocytes vitrified with Trehalose (TH) or Sucrose (SC). The oocytes were vitrified in two groups: 1) TH (n = 60) and 2) SC (n = 61). The oocyte warming (OW) was done, then the viability evaluation in TH (n = 5) and SC (n = 5) and the nuclear status (NS) in TH (n = 4) and SC (n = 5) were evaluated by classifying them into Germinal Vesicle (GV), Metaphase I and Not evaluable (NE). IVM was performed for 36 h in supplemented TCM-199 and mature oocytes were evaluated (n = 88) for NS [GV, MI = immature, MII = mature]. For IVF, frozen semen with a concentration of 3×10^6 sperm / ml was used, and the incubation was for 24 h in supplemented TALP medium. At this stage, the NS was seen as fertilized (F), unfertilized (NF) or NE. For the statistical analysis an exact Fisher test was used, $\alpha = 0.05$. For the TH group (n = 5), after warming, a viability of 60% was obtained, while for the SC (n = 5) the viability was 40%. All the oocytes were immature. In the IVM stage, maturation is not shown for the TH group (n = 38) and for the SC group (n = 50) only 2% of mature oocytes. In the IVF stage, with TH (n = 10) no fertilization occurred while with SC (n = 5) 20% fertilization was obtained. However, no difference ($P > 0.05$) was found between

the TH and SC groups. Due to the reduced sample, future research with a bigger sample of immature or mature oocytes is suggested for further evaluation of both TH and SC for WTD oocyte vitrification for use with IVP techniques as a model for other endangered cervid species.

CONTENIDO

RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Situación de Cérvidos en el Mundo.....	3
El Venado Cola Blanca	4
La reproducción.....	4
El macho.....	4
La hembra.....	8
Importancia de la Reproducción Asistida.....	9
Avances en Biotecnologías Reproductivas en Mamíferos	9
Biotecnologías Reproductivas en Cérvidos	11
Origen de los Gametos	12
Estructura y Composición del Ovocito	14
Maduración.....	15
Fertilización	17
Medios para la Producción <i>in vitro</i> de Embriones	18
Maduración <i>in vitro</i> de Ovocitos	19
Maduración <i>In Vitro</i> de Ovocitos Vitrificados.	20
Fertilización <i>In Vitro</i>	21
Procesamiento de Semen	22
Vitrificación	23
Crioprotectores.....	25
Métodos de Vitrificación.....	27
Vitrificación de ovocitos mamíferos	29
Desvitrificación	30
Fertilización <i>In Vitro</i> de Ovocitos Criopreservados.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Ovocitos.....	32
Análisis Estadístico	36

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES54
LITERATURA CITADA55

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Efecto de dos diferentes azúcares sobre el estado de cromatina de ovocitos de Venado Cola Blanca (VCB) en la etapa post-desvitrificación	41
2 Efecto de dos diferentes azúcares sobre el estado de cromatina en la etapa de Maduración <i>In Vitro</i> (MIV), en ovocitos de Venado Cola blanca(VCB).....	48
3 Efecto de dos diferentes azúcares sobre el estado de cromatina en la Fertilización <i>In Vitro</i> (FIV) de ovocitos de Venado Cola Blanca (VCB).....	53

INTRODUCCIÓN

Dentro de los ranchos dedicados a la ganadería, un rancho cinegético o granja de venados representa un aspecto nuevo tanto en manejo como administración de la fauna, ganadería y agricultura. Mediante el uso de biotecnologías en animales silvestres existe la posibilidad de mejorar los parámetros productivos y reproductivos a través del mejoramiento genético (Clemente-Sánchez *et al.*, 2017).

El uso de técnicas reproductivas en animales silvestres se ha incrementado de manera significativa durante los últimos años, ya sea con fines de conservación, o con enfoque de desarrollo de ranchos. Algunas de estas biotecnologías son la obtención de semen por electro eyaculado o *post mortem*, sincronización de estros, inseminación artificial (IA) y transferencia de embriones, las cuales, ya han estado bajo investigación en cérvidos. Debido a la alta demanda, los programas para ranchos cinegéticos y la disponibilidad para la época de cacería, dichas biotecnologías son un método efectivo para programas de conservación y producción (Martinez *et al.*, 2008).

Por otra parte, el procesamiento de semen, vitrificación de ovocitos y fertilización *in vitro* (FIV) permiten la selección y uso de animales que sean genéticamente superiores para incrementar parámetros productivos que son de importancia económica, así como la disminución del riesgo de patologías (Clemente-Sánchez *et al.*, 2017).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de trehalosa o sacarosa en la vitrificación de ovocitos de VCB para su posterior maduración y fertilización *in vitro*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Situación de Cérvidos en el Mundo

Los cérvidos se han presentado como una alternativa al desarrollo económico en las actividades agropecuarias en el medio rural. En México, la introducción de esta especie es una posibilidad como ganadería, ya que su aprovechamiento cinegético es la producción de carne, astas y piel (Herrera-Haro *et al.*, 2009).

La crianza y aprovechamiento de esta especie es legal en el país solo por medio de UMA (Unidad para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre), con el fin de promover esquemas alternativos de producción compatible con el cuidado ambiental por el uso de recursos renovables y evitar el deterioro ambiental (Gallina y Escobedo-Morales, 2009).

Los venados habitan en muchos ecosistemas del planeta, desde la tundra ártica hasta la selva, por lo que se les puede encontrar en Europa, Asia, América y algunas zonas árticas. Entre las 200 subespecies de venados alrededor del mundo, más de 40 están consideradas en peligro de extinción (Locatelli *et al.*, 2006). Los venados son parte de la familia de ungulados de América con 21 especies; en Norteamérica se encuentran el Alce (*Alces alces*), venado Bura (*Odocoileus hemionus*), el VCB (*Odocoileus virginianus*), entre otras especies. En México, se encuentran 4 especies de venados en vida silvestre: el VCB (*Odocoileus virginianus*), el venado Bura (*Odocoileus hemionus*), el Temazate rojo (*Mazama temama*) y el Temazate gris yucateco (*Mazama pandora*), siendo el venado Bura el de mayor tamaño y astas ramificadas, muy similares a la

estructura de astas del VCB (Mandujano *et al.*, 2010).

El Venado Cola Blanca

El VCB es uno de los rumiantes en fauna silvestre que está caracterizado por su gran fertilidad y prolificidad. Debido a sus características y disponibilidad, se puede considerar un animal modelo para aquellos cérvidos en peligro de extinción, principalmente, respecto a estudios reproductivos como preservación y fertilidad (Saenz, 2007; Gastal *et al.*, 2018).

Por otro lado, el incremento en la demanda de estos animales, exige mejorar genéticamente ciertas características, como lo son el aumento de peso corporal y tamaño de las astas. Recientemente, el trofeo de la cacería en venado ha incrementado los ingresos para los ganaderos, comerciantes y gobiernos, debido al alto movimiento que hay en la industria del venado (Saenz, 2007).

La reproducción. Dentro de los factores que se deben considerar respecto a la función reproductiva del cérvido, se encuentran el manejo, nutrición y sanidad. En el macho, la producción de espermatozoides se puede ver afectada de forma negativa, específicamente en la cantidad y calidad del semen. Como consecuencia, la tasa de partos se puede ver comprometida y traer en la hembra repeticiones de celo y alteraciones en el ciclo productivo (Herrera-Haro *et al.*, 2009).

El macho. En el caso del semental, su éxito reproductivo se determina por el número de hembras con las que consigue la cópula y su habilidad de fertilización. En poblaciones silvestres, la competencia entre machos es muy fuerte, llevando a la evolución de características que les permita ser superiores a

otros machos, aumentando la probabilidad de lograr la dominancia. Algunas de estas características son tamaño, peso corporal y tamaño de las astas, siendo esta última su herramienta de pelea (Herrera-Haro *et al.*, 2009).

En machos con estacionalidad reproductiva, como el carnero o caballo, se presenta una reducción en la producción espermática, pero no hay un arresto por completo. Por ejemplo, en el venado corzo (*Capreolus capreolus*) durante la primavera y el verano disminuye en gran medida la producción espermática y la concentración de testosterona circulante es muy baja; sin embargo, en otoño e invierno dicha concentración y la espermatogénesis son elevadas. En ciervo rojo, se ha reportado poca producción de espermatozoides en época no reproductiva. Por otro lado, el venado Axis presenta algunos cambios durante las estaciones en la producción de espermatozoides y morfología, pero mantienen la función testicular a lo largo del año (Saenz, 2007).

La calidad espermática se ve afectada por la estacionalidad de la especie, siendo un factor de impacto. El ciclo sexual, es evidente en animales silvestres de áreas templadas, observando cambios marcados en su comportamiento, condición corporal y parámetros reproductivos. García-Macías *et al.* (2006) reportaron las influencias estacionales en la actividad reproductiva del borrego cimarrón o carnero, afectando el tamaño testicular, patrones endocrinos gonadales, producción cuantitativa y cualitativa, así como el comportamiento sexual obtenido por las variaciones del fotoperiodo y medio ambiente. Se sabe que el tamaño testicular en el carnero es óptimo durante la época reproductiva y baja durante inactividad sexual. Estas variaciones cambian sustancialmente de

acuerdo al macho, raza, especie y su sensibilidad a los factores ambientales (García-Macías *et al.*, 2006).

Se ha demostrado (Saenz, 2007) que el líquido seminal no es necesario para la fertilización cuando se utilizan biotecnologías reproductivas, como IA, FIV o inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Dicho líquido es una combinación de fluido de las glándulas accesorias sexuales, el cual, al combinarse con los espermatozoides da lugar al semen. En forma natural, es beneficioso por sus múltiples funciones como la capacitación y viabilidad espermática, al entrar en contacto con el moco cervical, y sirve como buffer manteniendo el pH durante la fertilización; además, provee de nutrientes al espermatozoide, regula la reacción acrosomal, ayuda a la motilidad espermática, y ayuda a las contracciones del tracto de la hembra (Saenz, 2007).

Cuando la hembra recibe varias cópulas de machos distintos, el líquido seminal funciona como espermicida para el semen del segundo que monte a la hembra. Al final del eyaculado, deposita un tapón mucoso en el tracto de la hembra. Este sistema de protección es una masa de líquido seminal más denso que obstruye el paso al semen de otros machos, lo que impide que se lleve a cabo la fecundación. En el verraco y caballo, la última parte del eyaculado contiene un gel viscoso que tapa el cérvix para evitar que pase el semen del segundo macho, reacción fisiológica similar en algunos cérvidos (Saenz, 2007).

El macho tiene una estructura anatómica llamada epidídimo compuesta de cabeza, cuerpo y cola, estructura separada de los testículos. La cola del epidídimo, es un almacén donde los espermatozoides son retenidos hasta la eyaculación. Entre las diferentes especies, el tiempo que le toma a los

espermatozoides en viajar de la cabeza a la cola del epidídimo varía desde 4 a 13 d. Dicho procedimiento se logra debido a los movimientos peristálticos del músculo liso. En toros y verracos la frecuencia de eyaculaciones no afecta el rango en el que el espermatozoide viaja de la cabeza al cuerpo del epidídimo (Saenz, 2007).

Bajo condiciones de producción cinegética, se tiene la posibilidad de seleccionar sementales de acuerdo a sus parámetros reproductivos, así como, separar animales por sexo y edad para evitar la competencia agresiva entre machos al inicio de la época reproductiva. Según las instalaciones de manejo de la unidad de producción, se selecciona cierto número de hembras por macho asegurando la concepción, siendo desde 50 a 100 hembras por semental. La selección de sementales dependerá del éxito reproductivo en los criaderos (Herrera-Haro *et al.*, 2009).

Actualmente, existen cuatro métodos disponibles para la colecta de semen cuyo objetivo es preservar y utilizar la genética, asegurando su continuidad y variedad; estos son: servicio natural, vagina artificial, recuperación *post mortem* y electro eyaculación, siendo este último el más común. Cabe destacar que para colectar semen de cérvido es necesario recurrir a anestésicos para evitar el estrés cuando se lleve a cabo el manejo (Herrera-Haro *et al.*, 2009).

De este modo, la electroeyaculación nos permite la colecta de semen con calidad, ya que al estar bajo anestesia, se reduce el estrés, obteniendo diferencias significativas respecto a la colecta por monta natural. Por otro lado, mediante el uso de vagina artificial, se ha obtenido semen de buena calidad; sin

embargo, implica que el semental esté entrenado, siendo un riesgo para el técnico al momento de la colección (Martínez *et al.*, 2008).

Tanto en IA como en FIV se ha utilizado semen proveniente de recuperación *post mortem* del epidídimo, teniendo buenos resultados. Sin embargo, ambos métodos (electroeyaculado y recuperación post-mortem) son dependientes de las condiciones en las que se encuentre el animal en cuestión. En general, se utiliza la obtención de semen *post mortem* en animales de vida silvestre, mientras que aquellos que están bajo un sistema de producción cinegético son colectados por el método de electroeyaculación (Martínez *et al.*, 2008).

La hembra. En cérvidos la hembra es poliéstrica estacional, su ciclo dura de 18 a 21 d y de no estar preñada repetirá ciclo alrededor de 3 veces por estación. La duración del estro es en promedio de 12 a 24 h (Herrera-Haro *et al.*, 2009).

La transición en la hembra al inicio de la época reproductiva se caracteriza por los celos silenciosos o los ciclos cortos debido a una vida corta del cuerpo lúteo (duración de 8 a 10 d) en la mayoría de los cérvidos estudiados. En el venado Gamo se presentan múltiples ovulaciones silenciosas antes de comenzar a observar la expresión del celo (Asher, 2011). El ciclo estral de la venada está determinado genéticamente por su especie. La duración promedio de un ciclo es de 17 d en venado Sambar y Axis, 18 a 20 d en Ciervo Rojo, 21 a 23 d en venado Gamo, 24 a 27 d en Alce, 28 d en VCB (*Odocoileus virginianus*) y venado Cola Negra (*Odocoileus hemionus*) (Juárez, 2012). La duración promedio del ciclo

estral tiende a incrementar progresivamente durante la época reproductiva de la mayoría de las especies (Asher, 2011).

En base a lo anterior, el ciclo estral de la hembra en cérvidos puede ser manipulado y permitir la mejora de un programa reproductivo. Muchas de las técnicas han sido desarrolladas en animales domésticos y están siendo adaptadas dentro de programas reproductivos en venadas (Clemente-Sánchez *et al.*, 2017).

Importancia de la Reproducción Asistida

Las biotecnologías reproductivas son un conjunto de técnicas y procedimientos que tienen como finalidad promover la eficiencia de la reproducción. El uso de técnicas de reproducción asistida ha sido de gran importancia en la producción ganadera. Algunas de estas biotecnologías que se han desarrollado son la sincronización de estros, IA, congelación de gametos y embriones, superovulación, sexado de semen y embriones, transferencia de embriones, así como la producción de embriones *in vitro*. Las técnicas mencionadas han logrado un mejoramiento en la producción animal por medio del mejoramiento genético, la reducción del intervalo generacional, el control de enfermedades y la reducción de costos de producción (Hernández-Pichardo *et al.*, 2017).

Avances en Biotecnologías Reproductivas en Mamíferos

En los últimos 50 años se ha llevado a cabo un gran desarrollo en las biotecnologías reproductivas, algunas de las más importantes son la IA y la transferencia de embriones. El trabajo de la genética molecular y dichas

biotecnologías son una base para el mejoramiento continuo. El desarrollo de los procedimientos para clonación utilizando células somáticas como recurso genómico es uno de los logros más grandes, el cual permite abrir nuevos panoramas en las posibilidades de reproducción en animales de mayor calidad (Wrenzycki *et al.*, 2018).

En Estados Unidos, el mejoramiento genético ha orillado a generar diversas tecnologías para el ganado bovino. Las pruebas genéticas ayudan a una mejor selección de ganado por genes heredables que mejoren la producción y calidad, tanto para el productor como para el consumidor. La aplicación y beneficios de estas tecnologías como los protocolos de superovulación (Tríbulo *et al.*, 2011), transferencia de embriones, procesado de semen, junto a la vitrificación, forman parte de un importante papel en el futuro de la industria en el ganado bovino (Looney y Pryor, 2012), así como en cabras y ovinos (Fonseca *et al.*, 2016).

En pequeños rumiantes, se ha llevado a cabo la transferencia de embriones desde los años 1930, por medio de procedimientos quirúrgicos. Actualmente, se puede llevar a cabo por diferentes métodos como son laparoscopia, cirugía y técnica trans-cervical, con continuas mejoras en los procedimientos para mejorar el porcentaje de embriones obtenidos, así como reducir los efectos secundarios del procedimiento (Fonseca *et al.*, 2016).

De un eyaculado de toro se pueden obtener un promedio 200 a 300 dosis inseminantes con la posibilidad de ser congelado para su almacenamiento por tiempo indefinido. De un eyaculado de verraco se obtienen de 10 a 20 dosis inseminantes; sin embargo, en pequeños rumiantes aún se tiene una baja

eficiencia de un eyaculado, que se puede diluir para servir de 10 a 30 hembras (Wrenzycki *et al.*, 2018).

Biotechnologías Reproductivas en Cérvidos

El uso de técnicas reproductivas en animales silvestres se ha incrementado de manera significativa durante los últimos años, no solo con fines de conservación sino también en situaciones en que a la crianza de cérvidos se le ha dado un enfoque hacia el desarrollo de ranchos para la producción de carne, venado, velvet y trofeos. El ciervo rojo ha sido el que ha captado mayor atención de los productores e investigadores debido a la alta disponibilidad de ejemplares (Martinez *et al.*, 2008).

Existen bancos de recursos genéticos (GRBs, por sus siglas en inglés: “Genetic Resource Banks”), que en combinación con técnicas de reproducción asistida ofrecen beneficios en los programas de conservación de especies para mantener la biodiversidad y ayudar a la conservación de especies en peligro de extinción (García-Macías *et al.*, 2006).

La IA permite la selección y uso de animales que sean genéticamente superiores para incrementar parámetros productivos. Una de las ventajas de esta técnica es que permite optimizar el uso de ejemplares con genética superior. Mediante monta natural, se limita el uso de un macho a menos de 100 servicios por año en condiciones óptimas del semental, lo que equivale a tan solo 2 montas por semana. Además, se debe considerar el riesgo de exposición de los sementales a patologías de transmisión venérea hacia las hembras. Al manejar a los sementales para la obtención de semen, es posible detectar a aquellos

infértiles o con baja calidad de semen, ayudando así a mejorar las tasas de preñez (Clemente-Sánchez *et al.*, 2017).

El uso de la IA está directamente asociado a la sincronización de estros y ovulación para obtener mejores resultados y más homogéneos. Esto es posible con una buena alimentación en el hato y un medio ambiente favorable al parto y a la crianza de cervatos (Clemente-Sánchez *et al.*, 2017).

Las biotecnologías de reproducción asistida como lo son la superovulación y la transferencia de embriones, tienen como finalidad acelerar el mejoramiento genético. Desde los años 70s, el Ciervo Rojo, así como algunas subespecies, se han manejado en unidades en las que se ha incrementado rápidamente su producción hasta ser un negocio redituable en la industria. En base a ello, diversos investigadores han mostrado cada vez mayor interés en mejorar la eficiencia reproductiva y el uso de las biotecnologías en cérvidos buscando su futura aplicación a especies en peligro de extinción. Por otra parte, en un estudio realizado por Locatelli *et al.* (2005) se utilizaron gametos de ciervo rojo para la producción de embriones *in vitro* con la metodología de animales domésticos, con el fin de determinar las características específicas de la especie y así mejorar la técnica para cérvidos, así como determinar las características espermáticas, métodos de capacitación y medios utilizados con éxito.

Origen de los Gametos

Las células germinales, tanto en la hembra como en el macho, se desarrollan a partir de las células germinales primordiales. Después de que estas células germinales proliferan, migran a las crestas gonadales en desarrollo,

donde se convierten en ovogonias o espermatogonias (Hernández-Pichardo *et al.*, 2017).

La ovogénesis es la formación, desarrollo y maduración del gameto femenino. El proceso comienza en la vida embrionaria, las células germinales primordiales migran a la gónada embrionaria y se convierten en ovogonias, hasta la ovulación. La ovulación es el proceso en el que el ovocito es expulsado del folículo del ovario y reanuda la meiosis, por lo que comienza a madurar para llegar a ser un ovocito secundario con solo la mitad de los cromosomas, y de esta forma estar preparado para su fertilización (Fernández-Reyes *et al.*, 2012).

La ovogonia es una célula diploide que se multiplica por división meiótica para formar un ovocito primario, el cual va a entrar en su primera división meiótica (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012). La división celular pasa por diferentes etapas como son profase, metafase, anafase y telofase. En la división meiótica, la profase es dividida en periodos, siendo la vesícula germinal uno de estos. En mamíferos, la profase meiótica es completada en hembras hasta el diploteno, antes del nacimiento se quedan en una fase de detención meiótica, la cual es completada un poco antes de que inicie la ovulación, con los cambios preovulatorios en el folículo maduro (Fernández-Reyes *et al.*, 2012).

Poco después de la última mitosis, en las ovogonias se duplica el ADN y entran a una fase larga en profase de la primera división meiótica. Durante la etapa como vesícula germinal, los cromosomas homólogos se entrecruzan antes de que el ovocito entre a etapa de diploteno. Al iniciar la profase, la cromatina está difusa en el núcleo, presentándose un núcleo agrandado llamado vesícula germinal, donde crecen los organelos citoplasmáticos y se reproducen. En la

pubertad, se presenta una oleada de hormona luteinizante que va a desencadenar la reanudación de la meiosis, logrando así que los ovocitos lleguen a la metafase de la segunda división meiótica, en la ovulación. Los ovocitos con células cumulares a su alrededor llegan al oviducto, donde son fecundados y en la fertilización se produce la segunda división meiótica del ovocito (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012; Hernández-Pichardo *et al.*, 2017).

Los espermatozoides inician siendo gonocitos que migran a la membrana basal de los túbulos seminíferos, formando así las espermatogonias. En machos adultos, las espermatogonias mantienen una capa germinal lo que permite una producción cíclica de espermatocitos primarios, siendo los que pasan por la meiosis para producir espermatocitos secundarios y después espermátidas, que son células haploides y redondas, siendo así como se diferencian de los espermatozoides, que son flagelados (Hernández-Pichardo *et al.*, 2017).

Estructura y Composición del Ovocito

El ovocito de un mamífero consiste en el citoplasma dentro de una membrana de plasma, rodeado de una cubierta externa transparente conocida como zona pelúcida. La zona pelúcida está compuesta de un hidrogel, el cual está formado de glicoproteínas. Se ha encontrado que ejerce un importante papel biológico en la ovogénesis, fertilización, desarrollo, y eclosión fuera de la zona pelúcida, así como la protección de los ovocitos y embriones contra microorganismos presentes en el útero antes de la implantación (Choi *et al.*, 2015).

Maduración. La maduración del ovocito es un proceso influenciado por las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). Este proceso está compuesto por la maduración nuclear y la maduración citoplasmática (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012).

La vida fértil de los ovocitos es el periodo en el que pueden llegar a un desarrollo embrionario y fetal. En mamíferos, se considera que tiene un periodo corto, de 6 a 12 h. Los problemas asociados con el envejecimiento del ovocito post-ovulación incluyen: microtúbulos meióticos desorganizados, pérdida de cromosomas de la alineación en la metafase y migración cortical alterada. Se asocia a una oscilación en los patrones de los iones de calcio y niveles de glutatión, provocando un ciclo celular más corto. La cinética de la maduración del ovocito es un factor muy importante para un futuro desarrollo embrionario. En bovinos, la maduración ocurre aproximadamente a las 16 h de que se presenta el primer cuerpo polar, siendo un tiempo óptimo para la inseminación *in vitro*, una vez completada la meiosis (Berg *et al.*, 2002a).

El tiempo de maduración del ovocito en cérvidos ha recibido poca atención. Sin embargo, en ovocitos de Ciervo Rojo se han recuperado ovocitos en Metafase II del folículo entre las 18 y 20 h después de darse el pico de hormona luteinizante. Por otro lado, al trabajar con ovocitos madurados *in vitro*, estos han madurado entre 20 y 24 h. La diferencia de tiempo de MIV de los ovocitos entre especies para completar la maduración nuclear es notable, ya que, en bovinos es de 24 h, en ovinos de 26 a 30 h y en caprinos de 24 a 32 h (Berg *et al.*, 2002a).

Cuando el ovocito llega a la metafase de la segunda división meiótica (MII) se considera un ovocito maduro. Los ovocitos en vesícula germinal son considerados inmaduros, completan la primera división meiótica con la extrusión del primer cuerpo polar sin pasar por el proceso de la interfase, llegando a la metafase II. Cuando el ovocito maduro es fertilizado, completa la segunda meiosis y por expulsión del segundo cuerpo polar se convierte en una célula haploide (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012).

En la maduración citoplasmática, se llevan a cabo procesos celulares como acumulación de RNAm, proteínas, sustratos y nutrientes. Otro cambio importante son cambios post-transduccionales de proteínas y cambios ultraestructurales del citoplasma que son necesarios para que el ovocito pueda llevar a cabo un desarrollo embrionario (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012).

La comunicación entre las células cumulares y el ovocito es uno de los aspectos más importantes a lo largo de la maduración. Debido a esta comunicación, hay señales en respuesta a los factores producidos por el ovocito para estimular que se presente la ruptura de la vesícula germinal y poder así completar la maduración nuclear del ovocito (Shirazi *et al.*, 2007).

La maduración del espermatozoide se lleva a cabo cuando atraviesa por una serie de cambios estructurales y bioquímicos al pasar por el epidídimo, donde adquiere la movilidad necesaria para poder ser capaz de realizar una fertilización. Dichos cambios son debidos a la fisiología celular y bioquímica del espermatozoide para poder llevar a cabo la reacción acrosomal, habiendo algunas alteraciones en las proteínas de la membrana plasmática, en los lípidos, fosfolípidos y en su distribución (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012; Hernández-

Pichardo *et al.*, 2017). Una de las características que presenta el espermatozoide es la hipermotilidad, en conjunto a un flujo de iones de hidrógeno, que causa un aumento de pH intracelular, alterando el metabolismo y produciendo fosforilaciones de proteínas. La hipermotilidad se asocia con el contacto con las células del epitelio de oviducto, importante para el transporte de los espermatozoides en el útero y en el oviducto. Una vez que está listo el espermatozoide elimina moléculas de su membrana plasmática, exponiendo así los receptores para lograr la unión con la zona pelúcida del ovocito. La reacción acrosomal comienza al momento de que el espermatozoide interactúa con las células cumulares, liberándose la enzima Hialuronidasa, que permite el paso a los espermatozoides hacia la zona pelúcida (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012).

Fertilización

El desarrollo embrionario requiere de factores y características de óptima calidad, permitiendo que los gametos de la hembra y del macho puedan llevar a cabo la fertilización. Para poder obtener una producción de gametos, fecundación y un desarrollo embrionario viable deben suceder diversos procedimientos biológicos complejos y coordinados. Un ovocito maduro, solo se puede obtener de un folículo dominante para poder ser fecundado por el espermatozoide que cumpla características como haber tenido una capacitación, hiperactividad y reacción acrosomal. Una vez que el ovocito es fecundado se obtendrá un cigoto, el cual deberá sobrevivir bajo un ambiente lleno de nutrientes y temperatura que proveerán el oviducto y el útero para su desarrollo, obteniendo una cría al final de la gestación (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012).

Una vez que el espermatozoide logra penetrar la Zona Pelúcida y fusionarse con el oolema del ovocito, se desencadena la activación del mismo. Se logra completar en el ovocito el proceso de maduración meiótica, la capacidad de que se formen los pronúcleos y la secreción de gránulos corticales evitando la poliespermia. Cuando el ovocito es fertilizado, continúa a su segunda división meiótica hasta completar y expulsar el segundo cuerpo polar (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012).

Cuando el núcleo del espermatozoide entra en contacto con el oolema, la membrana nuclear se desintegra y el núcleo comienza a descondensarse. El Glutatioón es el encargado de reducir los puentes de disulfuro para la descondensación del núcleo del espermatozoide. La singamia toma lugar cuando se lleva a cabo la fusión de los pronúcleos tanto del macho como de la hembra (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012).

Medios para la Producción *in vitro* de Embriones

Los medios que tienen más éxito en el proceso de producción de embriones *in vitro* en cada etapa, ya sea maduración, fertilización y cultivo *in vitro* en varias especies son medios que contienen suero, gonadotropinas, estradiol, hormona del crecimiento, incluyendo factor de crecimiento epidermal y otros suplementos (Grazul-Bilska *et al.*, 2003).

La importancia de la composición de los medios está en la activación del genoma embrionario, donde se aumenta la actividad metabólica y por lo tanto, la síntesis de proteínas, la captación de carbohidratos y el consumo de oxígeno (Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012).

En la MIV de ovinos y caprinos, se ha utilizado el fluido folicular de folículos mayores a 4 mm como suplemento en medio de maduración TCM-199, con 100 ng de FSH ovina. Obteniendo un efecto positivo en la maduración citoplasmática, siempre y cuando dicho folículo no sea atrésico o de folículos estimulados con gonadotropinas. El mismo medio se ha utilizado con éxito en la MIV de ovinos y de venados Sika. Bajo las mismas condiciones se ha llevado a cabo la MIV de ovinos y caprinos con una extrusión del primer cuerpo polar (MII) entre las 16 y 24 h después de comenzada la maduración (Cognié *et al.*, 2004).

En cérvidos, el desarrollo de técnicas en reproducción asistida ha ido incrementando, se han realizado más esfuerzos para cubrir la necesidad de mejorar los protocolos existentes para la producción de embriones *in vitro*. El primer paso que es lograr una maduración de ovocitos *in vitro*, ya se ha llevado a cabo en Ciervo Rojo Ibérico y en venado Sika en laboratorio. Con fines de investigación, se obtienen ovocitos de ovarios post-mortem, siendo una fuente de ovocitos inmaduros. Al comparar con otras especies de cérvidos, el medio para MIV es generalmente adicionado con FSH, LH y diferentes aditivos como el estradiol, fluido folicular y suero fetal bovino (Berg *et al.*, 2002b; Siriaroonrat *et al.*, 2010; Macías-García *et al.*, 2017).

Maduración *in vitro* de Ovocitos

La colección de ovocitos para la producción de embriones *in vitro*, por lo general es de folículos en crecimiento. Los ovocitos están latentes, en etapa de Profase I. Para un cultivo celular estandarizado *in vitro*, es esencial crear el medio de reanudación meiótica para los ovocitos fuera del folículo, como sería al

momento de ser ovulado, buscando la progresión a la etapa de Metafase II. Sin embargo, hay una diferencia en la maduración de ovocitos *in vitro* en comparación con lo que ocurre *in vivo*. Por lo que es esencial una disponibilidad de ovocitos viables y competentes para un progreso en la MIV (Wani *et al.*, 2012).

Se han trabajado ovocitos madurados *in vitro* reportando tasas de clivaje cuando los ovocitos fueron madurados por 20 a 24 h en vez de 16 o 28 h. Las diferencias existen en el tiempo requerido para poder completar la maduración nuclear, por lo que los ovocitos se ven afectados por los suplementos utilizados en los medios *in vitro* (Berg *et al.*, 2002a). En alpacas, se han reportado variaciones desde 24 , 26 y hasta 42 h en el tiempo requerido para la MIV del ovocito, para que éste logre llegar a Metafase II (Ruiz *et al.*, 2013). Los avances en biotecnologías en cérvidos requieren más información básica de los gametos y un medio ambiente óptimo de cultivo buscando promover la maduración, la FIV y el desarrollo embrionario (Siriaronrat *et al.*, 2010).

Los ovocitos de mamíferos son fertilizados en la Metafase de la segunda división meiótica (Ajduk *et al.*, 2008). La maduración nuclear principalmente involucra segregación cromosomal, en cambio la maduración citoplasmática involucra la reorganización y almacenamiento de RNAm, proteínas, factores de transcripción que participan en el proceso de maduración, fertilización y embriogénesis temprana (Ferreira *et al.*, 2009).

Maduración *In Vitro* de Ovocitos Vitrificados.

Se han requerido años de investigación, para poder mejorar las técnicas de maduración de ovocitos vitrificados de diferentes especies y llevar a cabo la FIV

para la producción de embriones, con el fin de su criopreservación o transferencia a una hembra y así poder obtener una cría. El desarrollo de la criopreservación ha resultado un gran logro en la biotecnología para el almacenamiento de embriones provenientes de especies domésticas como bovinos, ovinos, porcinos, entre otros. Sin embargo, los ovocitos de mamíferos continúan siendo uno de los mayores retos debido a la sensibilidad de las células al enfriamiento y congelamiento (Fernández-Reyez *et al.*, 2012).

Fertilización *In Vitro*

La producción de embriones *in vitro* involucra tres etapas, que son la maduración de ovocitos *in vitro*, la FIV y el cultivo *in vitro* de embriones hasta que se formen las mórulas y blastocitos. Para cada etapa se requieren medios de cultivo que se asemejen al entorno que pudieran tener bajo condiciones *in vivo*, de acuerdo a cada etapa y a sus diferentes requerimientos. El éxito de dicho procedimiento involucra factores como técnicas utilizadas para la maduración y la fertilización de los ovocitos, así como la capacitación de las células espermáticas. Por lo tanto la composición de los medios de cultivo debe cubrir los requerimientos para las células en cada etapa (Cognié *et al.*, 2004; Rodríguez-Suástegui *et al.*, 2012).

El tiempo de maduración de los ovocitos mamíferos varía entre especies, algunos necesitan mayor tiempo en maduración que otros, siendo que hay especies que no se asemejan, por ejemplo, en porcinos puede requerir 44 h de incubación, mientras que en ovinos puede ser de 24 h (Fernández-Reyes *et al.*, 2012).

El momento de la ovulación y la fertilización no pueden ser precisamente predichos. Sin embargo, los procedimientos *in vitro* permiten coordinar la penetración del espermatozoide en el ovocito. La producción *in vitro*, a la vez permite contar con recursos abundantes y de bajo costo (siendo de ovarios obtenidos en rastros o de cacería) como ovocitos madurados, cigotos y embriones. Como resultado se obtienen conocimientos nuevos en algunas investigaciones de la fisiología, así como el surgimiento de biotecnologías nuevas como el sexado en embriones, la inyección intracitoplásmica de espermatozoides, la transferencia nuclear y la transgénesis (Comizzoli *et al.*, 2000b; Cognié *et al.*, 2004).

Procesamiento de Semen

Como se ha descrito anteriormente, uno de los métodos es a través de la colección post-mortem de espermatozoides de epidídimo. Sin embargo, a pesar del éxito en reproducción asistida, los espermatozoides obtenidos del epidídimo tienen sus limitaciones; algunas de ellas incluyen técnicas específicas para su congelación. Existen 3 métodos principales para la colección de animales post mortem, uno es cortar el epidídimo en un medio de cultivo específico, principalmente en pequeñas especies. El segundo método es con un bisturí o aguja se pincha el epidídimo, se extraen los espermatozoides y se coloca en un medio especial; ambos métodos requieren centrifugación para eliminar restos de tejido. El tercer método es por medio de enjuague que es preferentemente utilizado en Ciervo Rojo, en el vaso deferente se conecta una jeringa en la cual se inyecta aire y en la cola se hace una pequeña incisión para que las células espermáticas

drenen y de esta forma reducir la contaminación para obtener una mejor calidad de muestra (Saenz, 2007).

Vitrificación

La vitrificación se define como una solidificación similar al estado vítreo. Se lleva a cabo, a través de altas concentraciones de crioprotectores y una tasa de enfriamiento ultra rápida (Begin *et al.*, 2003) alcanzando altos rangos de enfriamiento de 16,700 °C/min (Criado-Scholz, 2012). Es un método que ha demostrado ser una técnica capaz de conservar la integridad de las estructuras de la célula (Gastal *et al.*, 2018). Este procedimiento, involucra un aumento extremo en la viscosidad de la solución crioprotectora eliminando la formación de cristales, siendo la principal lesión causada por congelamiento, por lo que se ha convertido en una alternativa para mejorar la criotolerancia en embriones producidos *in vitro*.

Durante la vitrificación del ovocito, el medio crioprotector debe tener una concentración alta de 5 o 6 molar (M), comparándola con la concentración de la congelación lenta de 1 a 2 M, la cual, requiere un descenso de temperatura de manera ultrarrápida (Zárate, 2006). El uso de altas concentraciones en crioprotectores puede ser tóxico o provocar un estrés osmótico a los embriones. La única forma de inducir la vitrificación es utilizando bajas concentraciones de los crioprotectores y aumentar la velocidad de enfriamiento (Abdalla *et al.*, 2010; Looney y Pryor, 2012).

El éxito de la vitrificación, depende de la sensibilidad de la célula y su etapa

(estado meiótico). Se ha demostrado en humanos, bovinos, porcinos y equinos que en ovocitos en Metafase II aumenta su capacidad de recuperación del daño a la vitrificación comparado con los que se encuentran en estado de Vesícula Germinal (Fernández-Reyez *et al.*, 2012).

La criopreservación de gametos y embriones se ha convertido en una herramienta para la preservación de material genético en diversas especies. La criopreservación de ovocitos facilita el almacenamiento de genética de animales de alto valor y resuelve limitantes asociadas a la estacionalidad y fertilidad. El desarrollo *in vitro* de ovocitos criopreservados aún tiene porcentajes bajos en diversas especies, dentro de las que se incluye al búfalo. Algunos factores que influyen en esto son el tamaño, el estado de maduración, las características de la membrana plasmática, la calidad del ovocito, la presencia o ausencia de las células cumulares, la especie, así como los procedimientos de criopreservación que han sido reportados para contribuir al éxito del mismo (El-Shalofy *et al.*, 2017).

Los daños de la criopreservación son clasificados en rangos de temperaturas. Es decir, de 15 °C a -5 °C ocurren las lesiones por enfriamiento, las cuales implican cambios estructurales como gotas lipídicas y membranas ricas en lípidos, siendo alteraciones parcialmente irreversibles. De -5 °C a -80 °C, en el momento de la formación de hielo extra e intracelular se producen cambios mecánicos sobre todas las estructuras. De -50 °C a -150 °C, por el efecto mecánico de la solución solidificada, hay un alto riesgo de que la Zona Pelúcida se rompa. La fase de almacenamiento a temperaturas inferiores a -150 °C (normalmente a -196 °C) se considera la menos peligrosa; solo la desvitrificación

accidental se considera el daño más frecuente. Por lo tanto, la vitrificación reduce los daños de la clasificación de +15 °C a -5 °C (Izaguirre y Díez, 2012).

Crioprotectores

La criopreservación permite un almacenamiento a largo plazo de células y tejidos viables; de tal forma que aplicar estas técnicas en ovocitos y embriones es una gran ventaja en el área de reproducción (Begin *et al.*, 2003).

Los crioprotectores cumplen la función de estabilizar proteínas, protegiendo la célula al ser sometida a un enfriamiento. La interacción crioprotector-proteína depende de los cambios de temperatura. Estos crioprotectores pueden producir dos tipos de toxicidad: directa (bioquímica) y osmótica. La toxicidad bioquímica, interfiere con las bombas iónicas y solubiliza los lípidos de membrana, dependiendo de la concentración, temperatura y la combinación de crioprotectores. Por otro lado, la toxicidad osmótica es debida a cambios de volumen en la célula, puesto que se debe regular la proporción de agua para mantener y estabilizar la membrana. En consecuencia, la lesión de la membrana celular está relacionada con el estrés osmótico (Zárate, 2006).

La toxicidad de la solución vitrificante ha sido minimizada a lo largo del tiempo. Por ejemplo, a través de la reducción en el uso de crioprotectores tóxicos, mejorando las combinaciones anteriormente utilizadas y al reducir el tiempo de exposición a la solución vitrificante (El-Shalofy *et al.*, 2017). Se ha sugerido que los azúcares son capaces de preservar la estructura y funcionalidad de la membrana al reducir el porcentaje de agua intracelular (Kuleshova *et al.*, 1999).

En base a lo anterior, el crioprotector debe ser lo menos tóxico posible para las células. Es importante tener presente que la toxicidad es dependiente de la temperatura, especialmente con los que son permeables. Algunas de las estrategias para disminuir los efectos tóxicos de las soluciones para vitrificación, es tener en cuenta que al emplear crioprotectores se debe usar aquellos de baja toxicidad y alta permeabilidad, uno de los principales es el Etilenglicol, utilizado en varias especies. El uso de dos o tres crioprotectores y la sinergia entre ellos deben ser estudiados antes de combinarlos. Por lo tanto, el tiempo de exposición a los crioprotectores debe ser gradual y ascendente (Izaguirre y Díez, 2012).

Se han utilizado diferentes crioprotectores como el Etilenglicol (EG), Glicerol (GLY), Dimetilsulfóxido (DMSO), Propilenglicol y 1,2-Propanediol (PROH), los cuales han sido utilizados en diferentes combinaciones para la vitrificación de ovocitos y embriones de mamíferos (Zárate, 2006; El-Shalofy *et al.*, 2017).

Se clasifican en dos tipos: permeables y no permeables (Izaguirre y Díez, 2012). Los crioprotectores permeables como el EG, destacan por su habilidad de penetración y su baja toxicidad (El-Shalofy *et al.*, 2017). El DMSO ha sido utilizado con éxito ya sea sólo o combinado con otros crioprotectores para la vitrificación de ovocitos en diferentes especies, incluyendo búfalos y bovinos (El-Shalofy *et al.*, 2017). La función de los mismos, es entrar a la célula y reemplazar el agua intracelular para modificar sus características fisicoquímicas y su respuesta al descenso de temperatura. Los mecanismos de acción son disminuir el punto de congelación de la suspensión e impedir la formación de cristales de hielo (Zárate, 2006; Izaguirre y Díez, 2012).

Los crioprotectores no permeables, son los que reducen el agua intracelular por efecto osmótico. Cuando se pone a la célula en contacto con una solución, la cual tiene una concentración elevada de los mismos, la célula será deshidratada para poder contrarrestar la diferencia de presión osmótica. Por lo que se clasifican en dos tipos: los de bajo peso molecular, es decir, monosacáridos, y disacáridos como TH, el cual es un disacárido que evita que las células sufran daño durante la criopreservación con resultados satisfactorios (Caturla-Sánchez, *et al.*, 2017), la SC (uno de los más empleados actualmente), Glucosa y Galactosa. Así también, los de alto peso molecular son polímeros como el Polivinilalcohol, el Polietilenglicol, el Ficoll y la Polivinil Pirrolidona (Zárate, 2006; Izaguirre y Díez, 2012).

Las soluciones de vitrificación que contienen TH o SC son ampliamente utilizadas para la criopreservación de ovocitos y embriones de ratón, bovino, equino, porcino y ovino. Los azúcares son usados en la criopreservación, ya que son un componente importante como buffer osmótico (Kuleshova *et al.*, 1999).

Métodos de Vitrificación

Durante el proceso de vitrificación, el estado meiótico durante la criopreservación puede afectar la viabilidad y el desarrollo. En la criopreservación de ovocitos maduros en Metafase II (MII) se han encontrado irregularidades en el huso meiótico, resultando en una interrupción en la alineación de los cromosomas y la desorganización en la red de microfilamentos. Por otro lado, en ovocitos inmaduros, como en la etapa de Vesícula Germinal, no poseen un huso meiótico organizado, por lo que, la criopreservación de ovocitos en este estadio

podiera ser una alternativa para evitar dañar el huso meiótico (El-Shalofy *et al.*, 2017).

La vitrificación de ovocitos maduros e inmaduros se ha llevado a cabo en diferentes especies con resultados variables. Sin embargo, aún no es reconocido un procedimiento bien establecido debido a su novedad y falta de información (Fernández-Reyez *et al.*, 2012).

La relación superficie/volumen es importante, ya que, debe existir un flujo adecuado de agua al exterior de la célula o entrada del crioprotector al usar aquellos que son permeables. Además, la presión osmótica de ambos lados del oolema es de suma importancia, por lo que es esencial conocer la tolerancia límite a las variaciones osmóticas y de volumen del ovocito; de este modo, esto ayudará a utilizar sustancias crioprotectores en concentración óptima. Se considera que los cambios de volumen del ovocito no deben sobrepasar el 30 %. Algunos de los problemas asociados a la congelación son: la integridad de las fibras y microtúbulos del huso meiótico, los gránulos corticales, y el daño a la Zona Pelúcida tornándola más dura, lo que reduce la tasa de fertilización (Zárate, 2006).

Para poder alcanzar altos rangos de enfriamiento, se han creado diversos métodos y dispositivos para reducir el volumen de las soluciones de vitrificación, como son Cryotop, Cryoloop, Superficie Sólida, Malla de Nylon, OPS (por sus siglas en inglés "Open Pulled Straw") y CPS (por sus siglas en inglés "Closed Pulled Straw"; El-Shalofy *et al.*, 2017).

Uno de los métodos antes mencionados es la vitrificación en Superficie Sólida ("SSV" por sus siglas en inglés), la cual cuenta con algunos beneficios,

como el no requerir un envasado, sino que son microgotas; por otra parte, se realiza mediante la reducción ultra rápida de la temperatura en una superficie de metal fría (10,000 °C/min; Dai *et al.*, 2000; Begin *et al.*, 2003; Somfai *et al.*, 2010; Beebe *et al.*, 2011). Una superficie limpia puede facilitar el manejo de las microgotas estériles (Dai *et al.*, 2000; Begin *et al.*, 2003; Zárate, 2006).

Vitrificación de ovocitos mamíferos. Los ovocitos bovinos son sensibles a bajas temperaturas; a pesar de los esfuerzos realizados en la investigación, la criopreservación sigue siendo una de las retos más grandes (Dai *et al.*, 2000). Los principales factores que afectan la criopreservación exitosa de embriones mamíferos son: la especie, el tipo y concentración de crioprotectores, las tasas de enfriamiento y desvitrificación, así como la etapa de desarrollo en la que los embriones son vitrificados (Shirazi *et al.*, 2010) .

En porcinos, la criopreservación estándar es un procedimiento realizado principalmente en la etapa de blastocitos, donde se han obtenido crías de embriones vitrificados. Sin embargo, en los ovocitos porcinos no se ha obtenido el mismo resultado positivo. Lo anterior, se asocia a tamaño del ovocito porcino, ya que, puede existir una proporción inadecuada de la superficie respecto al volumen. Los ovocitos porcinos, son más susceptibles a la hipotermia por la mayor cantidad de lípidos citoplasmáticos que contienen, esto en comparación con otros ovocitos de mamíferos (Galeati *et al.*, 2011). Se considera que los ácidos grasos en los ovocitos inmaduros de porcinos son dos veces más que en bovinos y hasta tres veces más que en ovinos (Mcevoy *et al.*, 2000).

Desvitrificación

La desvitrificación debe llevarse a cabo rápidamente. Las muestras se sumergen de forma casi inmediata en soluciones para desvitrificación (entre 39-41 °C). Es necesario realizar un proceso de eliminación de la solución vitrificante y a la vez de rehidratación celular; para ello, la desvitrificación se lleva a cabo en varias etapas, sometiendo a la célula vitrificada a soluciones con concentraciones decrecientes de criopreservadores no permeables para que por efecto osmótico los mismos salgan de la célula, evitando que haya cambios hídricos bruscos (Izaguirre y Díez, 2012).

Fertilización *In Vitro* de Ovocitos Criopreservados

El uso de la FIV en las diferentes especies de fauna silvestre es importante, ya que, cuando hay un número limitado de pajillas de espermatozoides obtenidas post mortem de un semental de alto valor genético, se puede eficientar el uso del semen para fertilizar incluso con una pajilla a cientos de ovocitos. El procedimiento de maduración y FIV en cérvidos ha sido adaptado a partir de protocolos de especies domésticas (Cognié *et al.*, 2004; Locatelli *et al.*, 2006).

Por lo tanto, se puede usar semen obtenido del epidídimo de cérvidos y ser conservado bajo las mismas condiciones que en animales domésticos. Al llevar a cabo grandes programas de restauración genética de especies en peligro de extinción, se puede usar producción de embriones *in vitro* y utilizar la transferencia de embriones a hembras receptoras (Cognié *et al.*, 2004).

En Ciervo Rojo se ha obtenido un bajo porcentaje de desarrollo al estadio de blastocito con medio suplementado con fluido de oviducto. En venado Sika, los embriones producidos *in vitro* no han logrado llegar a blastocitos, lo que sugiere que los requerimientos o la sensibilidad ambiental de los embriones de cérvidos son más específicos (Locatelli *et al.*, 2006).

El medio de capacitación que contiene suero de ovino en estro, promueve el flujo del colesterol de espermatozoides frescos en el carnero después de 1-5 h de incubación, así como la reacción acrosomal en la superficie de la Zona Pelúcida de los ovocitos. De los espermatozoides capacitados, se agregan 50 μ L a la gota de fertilización, para una concentración final de 1×10^6 espermatozoides por mL, se incuban por 17 horas a 39 °C a una atmósfera de 5 % de CO₂ (Cognié *et al.*, 2004).

En Ciervo Rojo y venado Axis, los espermatozoides pueden ser capacitados *in vitro*, agregando heparina al medio de FIV. A pesar de que las estadísticas son similares en Ciervo Rojo y en Sika, se ha observado poco desarrollo de embriones (Comizzoli *et al.*, 2000a)

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Manejo de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, en la Ciudad de México, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, del Departamento de Ciencias de la Salud. Los ovocitos de VCB que fueron obtenidos se vitrificaron para su posterior manejo. Una vez que se llevó a cabo la desvitrificación, los ovocitos se sometieron a pruebas de viabilidad y estado de cromatina, así como MIV y FIV con semen congelado de VCB.

Ovocitos. Los ovocitos utilizados para el presente experimento fueron donados por el Laboratorio de Conservation, Genetics & Biotech, LLC ubicado en Valley City, ND, USA. Dichos ovocitos se obtuvieron a partir de ovarios de venada Cola Blanca, de un total de 9 venadas, durante la cacería en la temporada reproductiva de diciembre a enero de 2017. Los ovarios fueron colocados en medio Syngro Holding por un máximo de 2 h *post mortem*. Una vez lavados los ovarios, se utilizó la técnica de “Slicing” en una caja de Petri con medio Syngro Holding para la obtención de ovocitos. Se procedió a evaluarlos al microscopio estereoscópico para su procesamiento (Siriaroonrat *et al.*, 2010).

Vitrificación. La solución de equilibrio consiste en el medio base PBS suplementado con 2 % de Etilenglicol, 2 % de Propilenglicol, y 4 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés). Los COC's fueron sometidos al medio de equilibrio por 13 a 15 min, posteriormente fueron lavados en gotas de 20 µl de solución de vitrificación. El último paso se llevó a cabo en menos de 30 s, en donde se tomaron los ovocitos en el capilar de una micropipeta, formando gotas de 2 a 3 µl de solución de vitrificación y se colocaron

sobre una balsa de aluminio flotando en nitrógeno líquido. Las microgotas vitrificadas se transfirieron a criotubos de 2 ml herméticamente cerrados y estos se colocaron en un termo con nitrógeno líquido para su conservación (Somfai *et al.*, 2014).

Desvitrificación. Los medios fueron equilibrados previamente al inicio del procedimiento, durante 20 min en una incubadora a 38 °C y 5 % de CO₂. Se utilizó una balsa de aluminio con un filtro sobre el nitrógeno líquido, para vaciar las gotas vitrificadas recuperadas del criotubo, posteriormente se enjuagó el filtro con nitrógeno líquido, para evitar pérdidas.

El medio de desvitrificación fue el mismo para los dos tratamientos (TH o SC) utilizados durante la vitrificación. El medio Oocyte Warming 1 (OW1, 500 µL) se calentó en baño María a 39 °C, ya que su temperatura debe ser mayor que la del resto de los medios OW y posteriormente se colocó en el pozo 1 del plato de 4 pozos (Thermo Scientific, Nunclon®). Los medios OW 2, 3 y 4, se colocaron (500 a 1000 µL a 38 °C) en los pozos 2, 3 y 4, respectivamente. Por separado se preparó una caja Petri de 35 mm para el medio de lavado, previo a la MIV (Somfai *et al.*, 2014).

Para la desvitrificación, se realizaron dos pruebas; una para evaluar la viabilidad, por medio de la tinción MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 0,5 mg/ml] y otra para evaluar el estado de la cromatina, con la tinción DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindole (1 µg/ml)].

Maduración *In Vitro*. Una vez recuperados los ovocitos, fueron previamente enjuagados en medio de maduración. Posteriormente, fueron colocados en

microgotas de 50 μ L de medio TCM-199, cubiertas con aceite mineral. El medio fue suplementado con hormona menopáusica humana (75 UI/ml) y factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml) para ser madurados a 38.5 °C con 5 % de CO₂ en una incubadora con humedad relativa al 90 % por 36 h.

Semen. Se colectó por medio de la técnica de electro eyaculación, utilizando un diluyente a base de 20 % de triladyl, 20 % de yema de huevo y 60 % de agua destilada. El semen se congeló en pajillas de 0.25 ml en donde se almacenó en nitrógeno líquido hasta su uso.

Para optimizar el uso de las pajillas de VCB, estas fueron fraccionadas en cuatro partes. Primero se preparó el baño de nitrógeno en una hielera pequeña, para posteriormente con unas pinzas sostener la pajilla para realizar el corte.

Se seleccionó la fracción a utilizar y el resto de las fracciones no utilizadas se colocaron en un goblet y se taparon con otro goblet con orificios, con el fin de que a pesar de que floten las fracciones no se pierdan.

Una vez realizado el corte, la fracción a utilizar se colocó en un tubo Eppendorf en baño María por 2 min a 35 °C. En la campana de flujo laminar, se eliminó la pajilla y el semen se enjuagó con medio de fertilización.

Posteriormente, se evaluó al microscopio y se diluyó con el medio de capacitación para realizar la técnica de “Swim up”, la cual consiste en colocar el paquete celular en el fondo de un tubo con medio de capacitación y centrifugarlo a 1000g por 3 min. Los espermatozoides vivos y motiles nadan hacia arriba y los espermatozoides muertos quedan en la parte de abajo.

Fertilización *in vitro*. Los COC's madurados fueron colocados en microgotas de 50 μ L con medio de FIV, TALP suplementado con heparina (10 μ g/ml), Penicilamina (0.075 mg/ml), Hipotaurina (10 M), Epinefrina (1 μ M) y BSA fracción V (0.4 %). Posteriormente, se añadió 20 μ L de semen con una concentración final de 3×10^6 espermatozoides/ml durante 24 h, en una incubadora a 38.5 °C con 5 % de CO₂.

Para evaluar la fertilización se llevó a cabo la prueba de estado de cromatina del ovocito para determinar la presencia de pronúcleos, lo que indicó si hubo fertilización.

Análisis Estadístico

Para determinar la asociación entre el uso de Trehalosa o Sacarosa en el medio de ovocitos vitrificados de venado cola blanca y su viabilidad y el estado de la cromatina después de la desvitrificación, así como grado de MIV y éxito en la FIV, se corrió la prueba exacta de Fisher utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, versión 9.0 para Windows). La asociación se consideró significativa cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La viabilidad de los ovocitos de VCB fue evaluada después de la etapa de desvitrificación. En el grupo de TH, se obtuvo un porcentaje de viabilidad de 60 % y en el de SC 40 %. En esta prueba, bajo las condiciones de la presente investigación, no se observó diferencia ($P > 0.05$).

Fernández-Reyes (2012) determinaron la viabilidad de ovocitos vitrificados en porcinos y ovinos por medio de la tinción MTT, la cual fue mayor del 90 % después de la desvitrificación para ambas especies, mientras que en el presente estudio solo se obtuvo un 60 % como máximo con el uso de TH, por lo que no se logran los mismos resultados que en las especies domésticas del estudio de Fernández-Reyes (2012).

Por otro lado, Galeati *et al.* (2011) llevaron a cabo un estudio en porcinos, donde evaluaron la viabilidad con triple tinción (Diacetato de fluorceína, Ioduro de Propidio y Hoescht 33342), considerando vivos a los ovocitos que tenían la membrana intacta y actividad de enterasa. Una vez incubados por dos horas, la tasa de sobrevivencia bajó de manera importante ($P < 0.05$).

El-Shalofy *et al.* (2016) utilizaron Azul de Tripán para evaluar la viabilidad en ovocitos de búfalo, con diferentes formas de vitrificación; las proporciones más altas de ovocitos viables fue con los métodos de vitrificación con Superficie Sólida (93.7 %); sin embargo, la tasa de recuperación fue baja. En el presente estudio se utilizó la misma metodología de vitrificación con ovocitos de VCB, en la cual se obtuvo 60 % de viabilidad después de ser vitrificados en superficie sólida.

En un estudio realizado en humanos, con mujeres de 35 años en promedio, se utilizaron ovocitos frescos y vitrificados. La tasa de supervivencia

alcanzó el 85.6 %. (Solé *et al.*, 2013). En otro estudio utilizaron Cryloop, obteniendo un 91.4 % de ovocitos que sobrevivieron después del proceso desvitrificación (Trokoudes *et al.*, 2011).

En cabras, Begin *et al.* (2003) criopreservaron ovocitos y embriones utilizando Cryloop (con 20 % DMSO, 20 % EG, 10 mg/ml Ficoll y 0.65 M SC) y vitrificación en Superficie Sólida (35 % EG, 5 % polyvinyl-pyrrolidone (PVP) y 0.4 % TH). En la técnica de Cryloop (65/73; 89 %) no hubo diferencia significativa con el control ni entre tratamientos. Para la vitrificación en Superficie Sólida obtuvieron una tasa de sobrevivencia más baja (47/78; 60 %) que la de los ovocitos del grupo control. De este modo, se utilizaron las mismas azúcares para vitrificación en técnicas similares, lo cual concurre con nuestro estudio con una viabilidad del 60 % de ovocitos de VCB tratados con TH. Es posible que dificultades técnicas asociadas con la vitrificación en Superficie Sólida pudieran explicar las menores tasas de sobrevivencia de ovocitos y embriones vitrificados al compararse con el grupo control.

Por otra parte, Yoshioka *et al.* (2014) obtuvieron un 87.1 % de ovocitos de porcino que sobrevivieron al proceso de la vitrificación al ser desvitrificados a una temperatura de 42 °C, siendo más alta que la de los que fueron calentados a una temperatura de 38 °C, con un 66.9 %; sin embargo, ambos fueron significativamente más bajos que el grupo control. En el presente estudio, se utilizó una temperatura de 39 °C en la primera solución y 38 °C en las otras 3 soluciones de desvitrificación, con lo que obtuvimos una viabilidad del 60 % en el grupo de TH, lo cual concurre con la temperatura de desvitrificación en porcinos, pero con SC la viabilidad fue de solo un 40 %.

El estado de la cromatina de los ovocitos se determinó al momento de la desvitrificación para identificar en qué etapa se encontraban, comparando los dos tratamientos: TH y SC. En el tratamiento con TH, se obtuvo un 50 % de ovocitos con Vesícula Germinal (VG) y un 50 % en Metafase I (MI). En el tratamiento con SC se obtuvo un 60 % de VG, 20 % en MI y 20 % de ovocitos no evaluables (NE), como se observa en la Cuadro 1.

Bajo las condiciones de la presente investigación, no se observó ninguna diferencia significativa entre grupos ($P > 0.05$), por lo que no existió evidencia suficiente para afirmar que existe asociación entre el tipo de azúcar TH o SC, utilizada en la vitrificación de ovocitos en VCB y el estado de la cromatina de los mismos al momento de su desvitrificación.

Galeati *et al.* (2011) reportan que en porcinos la exposición a los crioprotectores influyó ($P < 0.05$) en la morfología normal del huso meiótico del ovocito, a pesar de que la organización del cromosoma no tuviera variación. En un estudio realizado por Ozawa *et al.* (2007) con ovocitos porcinos vitrificados por la técnica de Superficie Sólida, se asoció la competencia del ovocito con el bajo desarrollo, en donde se puede atribuir a un daño en el huso meiótico y a la configuración en los cromosomas generada por la vitrificación en dichos ovocitos. En base a lo anterior, esto pudiera ser similar a los resultados del presente estudio, al presentarse una alteración en el huso meiótico que evitó que la competencia del ovocito le permitiera madurar.

Yoshioka *et al.* (2014) reportaron altos porcentajes de sobrevivencia en ovocitos porcinos vitrificados en la etapa de MII; sin embargo, es común que

muestren anomalías en el huso meiótico o acumulación de especies reactivas de oxígeno, por los procesos de enfriamiento y desvitrificación, afectando así su competencia para ser fertilizados y poderse desarrollar.

Cuadro 1. Efecto de dos diferentes azúcares sobre el estado de cromatina de ovocitos de Venado Cola Blanca (VCB) en la etapa post-desvitrificación

Azúcar	Estado de cromatina					
	VG	(%)	MI	(%)	NE	(%)
TH	2	50	2	50	0	0
SC	3	60	1	20	1	20

No hubo diferencia ($P < 0.05$) entre tratamientos Trehalosa (TH) y (SC) mediante la prueba exacta de Fisher. Siendo Vesícula germinal (VG), Metafase I (MI) y No evaluables (NE)

A las 36 h de MIV, se determinó el estado de la cromatina de los ovocitos en los grupos tratados con TH y con SC. En el Cuadro 3, se observa que con el tratamiento de TH se obtuvo un 66 % en la etapa de VG, 24 % MI, 0 % de MII, y 10 % de los ovocitos NE. En el tratamiento de SC se obtuvo un 84 % con VG, 10 % en MI, 2 % MII y 4 % NE.

Por lo tanto, bajo las condiciones de la presente investigación, no se observó una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos. Por lo que no existió evidencia suficiente para afirmar que existe asociación entre el tipo de azúcar TH o SC, utilizado en la vitrificación de ovocitos en VCB al momento de someterlos a MIV. Es decir, no existió evidencia de que el tipo de azúcar haya influido en el estado de la cromatina de los ovocitos de VCB.

Galeati *et al.* (2011) vitrificaron ovocitos en MII obteniendo un incremento significativo en el daño del huso meiótico y dislocación de cromosomas del plato metafásico. Después de 2 h de incubación, la tasa de sobrevivencia se vio afectada, ya que tuvo un descenso significativo de 16.4 %. En el grupo control 94.3 % de los ovocitos tenían la configuración del huso meiótico normal y 91.4 % el plato metafásico alineado. Debido a la baja sobrevivencia de ovocitos después de dos horas de desvitrificación, confirma que los ovocitos de porcinos vitrificados son altamente susceptibles en condiciones de cultivo *in vitro*. Algunos ovocitos mantienen la integridad de la membrana, pero la tasa de sobrevivencia es baja, situación similar a la reportada en el presente estudio con ovocitos vitrificados de VCB. No se observó diferencia significativa en los ovocitos hasta las 2 h de ser incubados, lo que sugiere que la configuración del huso meiótico normal, una vez

que sufre, es difícil o no se puede recuperar, debido a los daños causados por el proceso de vitrificación. De esta forma y al igual que en el presente estudio, el porcentaje de ovocitos con organización de los cromosomas normal no es influenciado de forma positiva después de la desvitrificación o incubación.

El-Shalofy *et al.* (2016) llevaron a cabo MIV en ovocitos de búfalo, en donde evaluaron la maduración nuclear con 1.0 % de aceto-orceína. La vitrificación en superficie sólida resultó en 75.5 % de maduración nuclear, siendo significativamente más alto que los ovocitos vitrificados de forma tradicional. Respecto al presente estudio con ovocitos de VCB, se obtuvo una maduración de 10 %, lo cual no coincide con los resultados obtenidos en búfalo.

Berg *et al.* (2002a) realizaron un estudio con ciervo rojo en el que analizaron el tiempo que toma la maduración nuclear *in vitro* en la especie. Se obtuvieron ovocitos por aspiración folicular y fueron madurados en medio TCM 199 suplementado con Piruvato, LH, FSH, estradiol y suero fetal bovino. Durante la maduración se obtuvieron muestras de ovocitos cada tres horas y posteriormente eran fijados para tinción en Lacmoid al 1 %. En los resultados, los ovocitos sometidos en fresco a MIV duraron en arresto como VG por las primeras 6 h de incubación. La membrana nuclear se comenzó a desvanecer pasadas las 6 h y a las 10.6 ± 0.6 h, 75 % de los ovocitos mostraron ruptura de Vesícula Germinal. El tiempo promedio en que el 50 % de los ovocitos llegaron a MI fue de 11.7 ± 0.4 h y a MII de 24.8 ± 0.9 h. La expansión completa de las células cumulares fue a las 18 h. Lo anterior, en cuestión de maduración nuclear, indica un periodo similar al de ovocitos frescos de ovinos y bovinos. En base a ello, se ajustó el tiempo de incubación para MIV de ovocitos vitrificados en VCB a 24 h;

sin embargo, al ser evaluados no se mostró actividad en la maduración nuclear de los ovocitos. Por lo tanto, en el presente estudio se decidió dar más tiempo (36h) a los ovocitos de VCB en incubación, relacionándolo a posibles daños que el ovocito pudo sufrir por la vitrificación en el huso meiótico que pudiera demorar la maduración de los mismos.

Siriaronrat *et al.* (2010) evaluaron la influencia del estradiol en el medio de cultivo buscando aprovechar los ovocitos de más baja calidad de VCB y a su vez evaluar la maduración nuclear *in vitro*. Los ovocitos obtenidos en fresco se cultivaron con o sin E₂ y las evaluaciones de maduración nuclear fueron a las 0, 3, 6, 12 y 24 h solo en los ovocitos de calidad 1. En presencia de E₂ y solo ovocitos de calidad 1, a las 0 h el 70 % pasaron a ruptura de VG. Después de 12 h, 70 % estaban en MI de maduración nuclear y a las 24 h *in vitro* 75 % llegó a MII. No se consideró la etapa del ciclo de la hembra, sin embargo, separaron por calidad los ovocitos, mientras que en la presente investigación se intentó madurar todos los ovocitos haciendo una evaluación morfológica. Por otro lado, la evaluación de maduración nuclear fue hecha con DAPI, al igual que en el presente estudio, en el que el tiempo de maduración fue de 24 h, lo cual no coincide con los resultados obtenidos al ser ovocitos vitrificados, ya que, la maduración nuclear fue comprometida. En el estudio con ovocitos frescos no correlacionaron la expansión de células cumulares a la maduración nuclear, ya que la mayor expresión del mismo fue a las 24 h, lo cual coincide con nuestro estudio al no observar cambios.

Somfai *et al.* (2010), llevaron a cabo un estudio en porcinos, en el que obtuvieron ovocitos para posteriormente ser vitrificados por la técnica de

Superficie Sólida, en etapa de VG, después de la desvitrificación fueron sometidos a MIV y FIV. Un 77.6 % de los ovocitos vitrificados fueron competentes para llegar a MII, lo cual es superior al porcentaje obtenido en el presente estudio. En ese estudio, en la solución de equilibrio utilizaron Citocalasina B, en la vitrificación. Este es un estabilizante del citoesqueleto que influye en la sobrevivencia del ovocito, pudiendo mejorar las tasas de MIV.

Los ovocitos en VG son más sensibles a los crioprotectores que los ovocitos maduros, debido a sus diferentes permeabilidades. Se considera que la presencia de las células cumulares puede afectar la permeabilidad del agua y de los crioprotectores; sin embargo, es de suma importancia para la maduración de los ovocitos. Por lo anterior, se sugiere una optimización en los tiempos de equilibrio y tratamiento en las soluciones de vitrificación, así como en el proceso de desvitrificación, en especial con ovocitos inmaduros. La vitrificación de ovocitos bovinos y porcinos ha sido asociada a cambios estructurales como la alteración de Actina y la Tubulina del citoesqueleto, así como la distribución anormal de las mitocondrias funcionales (Ajduk *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2014; Babayev y Seli, 2015). La regeneración de organelos después de la vitrificación puede ser un importante papel para recuperar la habilidad de criopreservación de los ovocitos. En ovocitos en MII, la despolimerización del huso meiótico puede ser recuperada después de la criopreservación, pero este proceso puede tomar una mayor cantidad de horas (Somfai *et al.*, 2010), por lo que se sugirió 36 h de MIV en ovocitos de VCB.

Como en el presente estudio, Moawad *et al.* (2012) trabajaron con oocitos ovinos y realizaron la técnica de vitrificación en Superficie Sólida utilizando como

solución de vitrificación EG 5%, PVP y 0.4 M de TH, con desvitrificación de 4 pasos, disminuyendo la concentración de TH. La viabilidad fue evaluada por morfología, los ovocitos recuperados fueron sometidos por 24 h a MIV, después de ello se hizo evaluación nuclear con Aceto Orceína. La FIV se llevó a cabo y la evaluación post inseminación fue a las 18 h utilizando Hoechst para los presuntos cigotos y DAPI para los ovocitos. Después de la vitrificación se recuperó un 75.7 % de ovocitos y de esos un 82.45 % fueron considerados viables, lo cual es un poco más alto de los resultados obtenidos en el presente estudio. En MIV, la expansión de células cumulares se vio significativamente afectada contra el control, con un 41.3 % de SSV y 80.9 % del control. A las 24 h post maduración el número de ovocitos que se mantuvieron en VG fue de 62.9 % contra 9.6% del grupo control, en comparación al estudio realizado en VCB los resultados en el grupo de TH son similares, obteniendo 66 % VG y en el grupo de SC fue menor ya que se obtuvo un 84 % VG a las 36 h en MIV.

Por lo anterior se asume que después de la vitrificación la reanudación de la meiosis no se logra y se mantiene en VG, esto bloquea al desarrollo por la falla en la síntesis de proteínas debida al congelamiento. Dicho enfriamiento afecta la integridad del huso meiótico y las vesículas de los gránulos corticales.

En otro estudio realizado por Yoshioka *et al.* (2014), con ovocitos de porcino vitrificados, utilizaron la técnica de vitrificación en Superficie Sólida, como solución de vitrificación al igual que el presente estudio utilizaron PVP, TH, EG, PG y BSA. Se llevó a cabo MIV y FIV. La evaluación de estatus nuclear fue con Aceto Orceína. En MIV obtuvieron un 61.7 % de ovocitos maduros, considerándolo un resultado positivo siendo vitrificados en la etapa de VG. Sin

embargo, antes de la solución de equilibrio tuvieron los ovocitos un pretratamiento con Citocalasina B, y este estabilizador del citoesqueleto pudo haber ayudado a que los ovocitos pudieran madurar y ser fertilizados.

Fernández-Reyes (2012) señala que la viabilidad después de la maduración, sobre todo en la técnica de vitrificación Cryotop, fue extremadamente variable (4 a 24 %). Galeati *et al.* (2011) en el estudio con porcinos desvitrificaron ovocitos, una vez incubados por dos horas, la tasa de sobrevivencia bajó de manera importante ($P < 0.05$). Por lo que se pudo afirmar que definitivamente la criopreservación dañó irreversiblemente a los ovocitos

Cuadro 2. Efecto de dos diferentes azúcares sobre el estado de cromatina en la etapa de Maduración *In Vitro* (MIV), en ovocitos de Venado Cola blanca(VCB)

Azúcar	Estado de Cromatina							
	VG	(%)	MI	(%)	MII	(%)	NE	(%)
TH	25	66	9	24	0	0	4	10
SC	42	84	5	10	1	2	2	4

No hubo diferencia ($P < 0.05$) entre tratamientos Trehalosa (TH) y Sacarosa (SC) mediante la prueba exacta de Fisher. Siendo Vesícula germinal (VG), Metafase I (MI), Metafase II (MII) y No evaluables (NE)

Después de llevar a cabo la FIV, por medio de la evaluación del estado de la cromatina de los ovocitos, se determinó la etapa nuclear en la que se encontraba, haciendo una comparación entre los dos tratamientos TH y SC. En el tratamiento de TH no se obtuvieron ovocitos fertilizados, un 60 % no fue fertilizado y 40 % no fueron evaluables. Por otro lado, en el grupo de SC se observó un 20 % de fertilización, 40 % de no fertilizados y 40 % no fueron evaluables (Cuadro 3). Por lo tanto, bajo las condiciones de la presente investigación, no se observó ninguna diferencia entre los grupos evaluados ($P > 0.05$), no existió evidencia suficiente para afirmar que existe asociación entre el tipo de azúcar (TH o SC) utilizado en la vitrificación de ovocitos de VCB y el estado de cromatina de los mismos al momento de la FIV.

De acuerdo a Comizzoli *et al.* (2000), los porcentajes de FIV en Ciervo Rojo con diferentes concentraciones de espermatozoides, a 1.0×10^6 espermatozoides/mL no se observó poliespermia. Por lo que en el presente estudio se pudo utilizar una concentración final de 3×10^6 espermatozoides /ml con el fin de obtener una fertilización del ovocito.

Santalo *et al.* (2013) vitrificaron ovocitos de mujeres de alrededor de 35 años y llevaron a cabo la FIV con ovocitos frescos y vitrificados con resultados de 80.7 % vs un 78.2 %, respectivamente, no encontrando diferencias significativas. En el presente estudio se encontró un bajo porcentaje en la tasa de fertilización en ovocitos vitrificados en VCB.

Galeati *et al.* (2011) demostraron en porcinos que hubo diferencia significativa en la tasa de fertilización entre grupos, estableciendo que la exposición a los crioprotectores y la vitrificación aumenta la cantidad de ovocitos

degenerados, lo cual coincide con lo encontrado en el presente estudio. Mientras que Egerszegi *et al.* (2013) establecen que los ovocitos vitrificados en la etapa de VG tuvieron una mejor habilidad de poder exponer el segundo cuerpo polar y sostener la formación del pronúcleo del macho después de llevar a cabo FIV, en comparación de los ovocitos vitrificados en MII. Lo anterior coincide con la etapa de los ovocitos de VCB que fue en VG mayormente, aumentando la posibilidad de que a pesar de ser inmaduro puede desarrollar los pronúcleos.

En porcinos, Nohalez *et al.* (2015) realizaron un estudio conformado por un grupo control y dos grupos de vitrificación, uno con EG + DMSO y otro con EG + PG. El porcentaje de ovocitos degenerados después de la MIV fue significativamente más alto en los grupos de ovocitos vitrificados que en los frescos (EG + DMSO: 59.8 ± 2.3 % y EG + PG: 56.2 ± 2.6 %). La tasa de fertilización más alta en EG+ PG con 39.6 ± 2.4 %, coincide con dos de los ingredientes de la solución de vitrificación utilizada, demostrando que es posible la fertilización después del uso de EG y PG.

Somfai *et al.* (2010) mencionan que la vitrificación en ovocitos de porcino en estado de VG es un modo eficiente de evitar la activación inducida por enfriamiento y el endurecimiento de la Zona Pelúcida. Por otro lado, Ozawa *et al.* (2007) establecen que a pesar de los daños al huso meiótico, existen otros factores que alteran las tasas de fertilización y reducen la habilidad del ovocito de ser penetrado para formar pronúcleos después de llevar a cabo FIV. Puede ser un cambio estructural en la Zona Pelúcida, como su endurecimiento o cambios en las características de la membrana, promoviendo una excitosis precoz de los gránulos corticales causada por la criopreservación. Se ha

encontrado que dos de los crioprotectores más comunes, como son el DMSO y el EG, causan un incremento de calcio que promueve una exocitosis de los gránulos corticales y provocan el endurecimiento de la Zona Pelúcida durante la vitrificación (Larman *et al.*, 2006).

Moawad *et al.* (2012) llevaron a cabo FIV de ovocitos ovinos vitrificados con TH y obtuvieron una tasa significativamente baja de fertilización con un 39.3 % vs el grupo control con 64.7 %. De los ovocitos que no fueron fertilizados, fue más alto el grupo de VSS con 55.3 % comparado con el 20 % del grupo control. Por lo tanto, en la vitrificación se puede presentar una despolimerización del huso meiótico orientándolo a una aneuploidía, una liberación temprana de los gránulos corticales, provocando el endurecimiento de la Zona Pelúcida, así como alteraciones en la misma en las glicoproteínas, especialmente en la ZP2 que es la responsable de dicho endurecimiento y no permite la fertilización.

En porcinos, se han estudiado diferentes protocolos de vitrificación. Beebe *et al.* (2011) utilizó una técnica de vitrificación en Superficie Sólida, y argumenta que los lípidos intracelulares de los embriones se vuelven tóxicos durante la criopreservación, por lo que polarizando las gotas de lípidos fuera de los blastómeros mediante centrifugación aseguran que hay mejoras en el éxito de la criopreservación.

En Ciervo Rojo, Soler *et al.* (2007) llevaron a cabo un estudio donde superovularon hembras y de los embriones recuperados una parte fue transferida en fresco (n=28) con 64 % de preñez, otra parte se congeló con EG (n=10) con un 70 % de preñez y otra parte fue vitrificada por OPS con EG, DMSO, y 0.5 M SC en medio Holding (n=15) con un 53.3 % de preñez, estableciendo que no

hubo diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos. Esto fue con un protocolo adaptado de bovinos y ovinos. En el presente estudio se hizo al igual, una adaptación de un estudio en porcinos y ovinos.

Cuadro 3. Efecto de dos diferentes azúcares sobre el estado de cromatina en la Fertilización *In Vitro* (FIV) de ovocitos de Venado Cola Blanca (VCB)

Azúcar	Estado de cromatina					
	F	(%)	NF	(%)	NE	(%)
TH	0	0	6	60	4	40
SC	1	20	2	40	2	40

No hubo diferencia ($P < 0.05$) entre tratamientos Trehalosa (TH) y Sucrosa (SC) mediante la prueba exacta de Fisher. Siendo Fertilizados (F), No fertilizados (NF) y No evaluables (NE)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden ser útiles como antecedentes para la vitrificación de ovocitos inmaduros de VCB y servir como base para futuras investigaciones debido a la escasez de información disponible, por lo que se recomienda realizar mayor investigación en el área.

La vitrificación en etapas tempranas del ovocito, como en la etapa de Vesícula Germinal, utilizando diferentes técnicas como Superficie Sólida o Cryoloop, reduce la probabilidad de obtener una MIV. Sin embargo, la criopreservación de ovocitos en etapa de Vesícula Germinal pudiera proveer ovocitos que permitan llevar a cabo investigación sin importar la estacionalidad de la especie y evitando otras limitantes de disponibilidad.

A pesar de los resultados obtenidos en el presente trabajo con VCB, aún hay mucho que mejorar en la vitrificación de ovocitos de la especie, considerando todos los factores que puedan influir para lograr una FIV. Se recomienda considerar aspectos como: una mejor protección al ovocito con un estabilizante de citoesqueleto o protección al huso meiótico con un antioxidante para que pueda resistir el proceso de vitrificación con mejores tasas de recuperación.

LITERATURA CITADA

- Abdalla, H., M. Shimoda, H. Hara, H. Morita, M. Kuwayama, M. Hirabayashi, y S. Hochi. 2010. Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: Effect of developmental stage and age. *Theriogenology* 74:1028–1035.
- Ajduk, A., A. Malagocki, y M. Maleszewski. 2008. Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca²⁺ oscillations. *Reprod. Biol.* 8:3–22.
- Asher, G. W. 2011. Reproductive cycles of deer. *Anim. Reprod. Sci.* 124:170–175.
- Babayev, E., y E. Seli. 2015. Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 27:175–181.
- Beebe, L. F. S., E. G. Bouwman, S. M. Mcilfattrick, y M. B. Nottle. 2011. Piglets produced from in vivo blastocysts vitrified using the Cryologic Vitrification Method (solid surface vitrification) and a sealed storage container. *Theriogenology* 75:1453–1458.
- Begin, I., B. Bhatia, H. Baldassarre, y C. L. Keefer. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59:1839–1850.
- Berg, D. K., J. Thompson, y G. Asher. 2002a. Development of in vitro embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*) Part 2 . The timing of in vitro nuclear oocyte maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 70:77–84.
- Berg, D. K., P. A. Pugh, J. G. Thompson, y G. W. Asher. 2002b. Development of in vitro embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*) Part 3 . In vitro fertilisation using sheep serum as a capacitating agent and the subsequent birth

- of calves. *Anim. Reprod. Sci.* 70:85–98.
- Choi, J. K., T. Yue, H. Huang, G. Zhao, M. Zhang, y X. He. 2015. The Crucial Role of Zona Pellucida in Cryopreservation of Oocytes by Vitrification. *Cryobiology*.doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.012>
- Clemente-Sánchez, F., J. Gallegos-Sánchez, y C. Cortéz-Romero. 2017. Manual de Reproducción Asistida para el Venado. *Man. Reprod. Asistida para venado cola blanca*. Colegio Postgraduados, Lab. Reprod. Anim. Campus San Luis Potosí, México. Versión 4:18–52.
- Cognié, Y., N. Poulin, Y. Locatelli, y P. Mermillod. 2004. State-of-the-art production , conservation and transfer of in-vitro -produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 16:437–445.
- Comizzoli, P., R. Mauget, y P. Mermilod. 2000a. Assesment of in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology* 56:261-274.
- Comizzoli, P., P. Mermflod, Y. Cogni, N. Chai, X. Legendre, y R. Mauget. 2000b. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the Sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 55:649-659.
- Criado-Scholz, E. 2012. The Problem of Contamination: Open vs. Closed vs. Semi-Closed Vitrification Systems. In: *Current frontiers in cryopreservation*. In Tech, open access publisher. Marbella, Spain. p. 105–131.
- Dai, Y., S. Jiang, y X. Yang. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer 1 ´ s Dinnye. *Biol. Reprod.* 518:513–518.
- El-Shalofy, A. S., A. R. Moawad, G. M. Darwish, S. T. Ismail, A. B. A. Badawy, y M. R.

- Badr. 2017. Cryobiology Effect of different vitri fi cation solutions and cryodevices on viability and subsequent development of buffalo oocytes vitri fi ed at the germinal vesicle (GV) stage. *Cryobiology* 74:86–92.
- Fernández-Reyes F., 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. Tesis Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, México, DF, México.
- Fernández-Reyez, F., Y. Ducolomb, S. Romo, E. Casas, Z. Salazar, y M. Betancourt. 2012. Viability, maturation and embryo development in vitro of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology* 64:261–266.
- Ferreira, E. M., A. A. Vireque, P. R. Adona, F. V. Meirelles, R. A. Ferriani, y P. A. A. S. Navarro. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71:836–848.
- Fonseca, J. F., J. M. G. Souza-Fabjan, M. E. F. Oliveira, C. R. Leite, P. M. P. Nascimento-Penido, F. Z. Brandão, y K. C. Lehloenya. 2016. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 86:144–151.
- Galeati, G., M. Spinaci, C. Vallorani, D. Bucci, E. Porcu, y C. Tamanini. 2011. Pig oocyte vitrification by cryotop method: Effects on viability , spindle and chromosome configuration and in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 127:43–49.
- Gallina, S., y L. arturo Escobedo-Morales. 2009. Análisis sobre las Unidades de Manejo (UMAs) de ciervo rojo (*Cervus elaphus* Linnaeus , 1758) y wapiti (*Cervus canadensis* (Erxleben , 1777) en México : problemática para la conservación de los ungulados nativos . *Trop. Conserv. Sci.* 2:251–265.

- García-Macías, V., F. Martínez-Pastor, M. Álvarez, S. Borragan, C. A. Chamorro, A. J. Soler, L. Anel, y P. De Paz. 2006. Seasonal Changes in Sperm Chromatin Condensation in Ram (*Ovis aries*), Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*), and Brown Bear (*Ursus arctos*). *J. Androl.* 27:837–846.
- Garza, D., M. Camacho, M. Gaulty, y W. Holtz. 2018. Technical Note : Transfer of caprine blastocysts vitrified by the open pulled straw (OPS) or the solid surface procedure and warmed in sucrose-free medium. *Small Rumin. Res.* 165:111–114.
- Gastal, G. D. A., F. L. N. Aguiar, A. P. R. Rodrigues, J. M. Scimeca, G. A. Apgar, W. J. Banz, J. M. Feugang, y E. L. Gastal. 2018. Cryopreservation and in vitro culture of white-tailed deer ovarian tissue. *Theriogenology* 113:253–260.
- Grazul-bilska, A. T., J. T. Choi, y J. J. Bilski. 2003. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after in vitro fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 59:1449–1457.
- Hernández-Pichardo, J. E., J. M. Betancourt, Y. Ducolomb, R. Fierro, y S. Romo. 2017. Formación de pronúcleos mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) seleccionados por la unión a la zona pelúcida en ovocitos de ovino activados químicamente. Tesis doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana. Cd. de México, México
- Herrera-Haro, J. G., J. R. Bárcena-Gama, L. A. Tarango-Arámbula, H. Ruiz-Hernández, y G. Aguilar-Tipacamú. 2009. Características reproductivas de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) al inicio de la época de empadre en el trópico at the beginning of the mating season in the tropic. *Quehacer Científico* 1:35–43.
- Izaguirre, E., y C. Díez. 2012. Adaptación de un método de vitrificación/ calentamiento en fiberplug para la transferencia directa de blastocitos bovinos producidos in

- vitro. Tesis Maestría, Universidad de Oviedo. Oviedo, España
- Juárez, D. S. 2012. Comportamiento sexual del venado cola blanca (*Odocoileus Virginianus*) Aspectos Generales. Monografía Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México
- Kuleshova, L. L., D. R. Macfarlane, A. O. Trounson, and J. M. Shaw. 1999. Sugars Exert a Major Influence on the Vitrification Properties of Ethylene Glycol-Based Solutions and Have Low Toxicity to Embryos and Oocytes. *Cryobiology* 38:119–130.
- M.G. Larman, C.B. Sheehan, D.K. Gardner, (2006) Calcium free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction* 131: 53–61.
- Locatelli, Y., Y. Cognié, J. C. Vallet, G. Baril, M. Verdier, N. Poulin, X. Legendre, y P. Mermillod. 2005. Successful use of oviduct epithelial cell coculture for in vitro production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos. *Theriogenology* 64:1729–1739.
- Locatelli, Y., J. C. Vallet, F. P. Huyghe, Y. Cognie, X. Legendre, y P. Mermillod. 2006. Laparoscopic ovum pick-up and in vitro production of sika deer embryos : Effect of season and culture conditions. *Theriogenology* 66:1334–1342.
- Looney, C. R., y J. H. Pryor. 2012. Novel bovine embryo transfer technologies in the United States. *Anim. Sci. J.* 9:404–413.
- Macías-García, B., L. González- Fernández, E. Matilla, N. Hernández, J. Mijares, y F. Sánchez-Margallo. 2017. Oocyte holding in the Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*): Effect of initial oocyte quality and epidermal growth factor addition on in vitro maturation. *Reprod. Dom. Anim.* p.1–6. doi:10.1111/rda.13099.

- Mandujano, S., T. de J. Pérez, L. A. Escobedo, C. Yañez, A. Gonzáles, L. Pérez, A. Ortiz, y M. Ramos. 2010. Venados: animales de los dioses. INECOL, AC, Xalapa, Veracruz, México.
- Mao, L., H. Lou, Y. Lou, N. Wang, and F. Jin. 2014. Behaviour of cytoplasmic organelles y cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod. Biomed.* 28, 284–299
- Martínez, A. F., F. Martínez-Pastor, M. Álvarez, M. R. Fernández-Santos, M. C. Estes, P. de Paz, J. J. Garde, y L. Anel. 2008. Sperm parameters on Iberian red deer: Electroejaculation and post-mortem collection. *Theriogenology* 70:216–226.
- Martinez, A. F., M.P. F., M. Alvarez, M. R. Fernandez-Santos, M. C. Estes, P.dePaz, J. J. Garde, y L. Anel. 2008. Sperm parameters on Iberian red deer : Electroejaculation and post-mortem collection. *Theriogenology* 70:216–226.
- Mcevoy, T. , G. D. Coull, P. J. Broadbent, J. S. M. Hutchinson, y B. K. Speake. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle , pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 118:163–170.
- Moawad, A. R., P. Fisher, J. Zhu, I. Choi, Z. Polgar, A. Dinnyes, y K. H. S. Campbell. 2012. Cryobiology In vitro fertilization of ovine oocytes vitrified by solid surface vitrification at germinal vesicle stage q. *Cryobiology* 65:139–144.
- Nieman, H., y C. Wrenzycki. 2018. *Animal Biotechnology 1 Reproductive Biotechnologies.* (H. Niemann and C. Wrenzycki, editors.). Springer, Cham, Switzerland.
- Nohalez, A., C. A. Martinez, M. A. Gil, C. Almiñana, J. Roca, E. A. Martinez, y C. Cuello. 2015. Effects of two combinations of cryoprotectants on the invitro developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes. *Theriogenology* 84:545–552.
- Ozawa, M., J. Noguchi, H. Kaneko, T. Nagai, y K. Kikuchi. 2007. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid

surface vitrification : Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage q. *Cryobiology* 55:115–126.

Rodríguez-Suástegui, J. L., Y. Duclomb, J. E. Hernández-Pichardo, E. Casas, y S. Romo. 2012. Evaluación del desarrollo embrionario in vitro en ovino utilizando medio de cultivo permanente o secuencial. Tesis Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana. México DF, México

Ruiz, J., L. Landeo, J. Mendoza, M. Artica, J. E. Correa, M. Silva, M. Miragaya, y M. H. Ratto. 2013. Vitrification of in vitro mature alpaca oocyte : Effect of ethylene glycol concentration and time of exposure in the equilibration and vitrification solutions. *Anim. Reprod. Sci.* 143:72–78.

Saenz, J. R. 2007. Cryopreservation of White Tail Deer Epididymal Sperm for Artificial Insemination. LSU Master's Theses. 3362

Shirazi, A., N. Shams-esfandabadi, S. M. Hosseini, y I. Karimi. 2007. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. *Sci. Direct.* 68:291–295.

Shirazi, A., M. Soleimani, M. Karimi, H. Nazari, E. Ahmadi, y B. Heidari. 2010. *Cryobiology* Vitrification of in vitro produced ovine embryos at various developmental stages using two methods *Cryobiology* 60:204–210.

Siriaronrat, B., P. Comizzoli, N. Songsasen, y S. L. Monfort. 2010. Oocyte quality and estradiol supplementation affect in vitro maturation success in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Theriogenology* 73:112–119.

Solé, M., J. Santalo, M. Boada, E. Clua, I. Rodri, F. Martí, B. Coroleu, P. N. Barri, y A. Veiga. 2013. How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles ? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus

- vitrified sibling oocytes. *Hum. Reprod.* 28:2087–2092.
- Soler, J. P., N. Mucci, G. G. Kaiser, J. Aller, J. W. Hunter, T. E. Dixon, y R. H. Alberio. 2007. Multiple ovulation and embryo transfer with fresh, frozen and vitrified red deer (*Cervus elaphus*) embryos in Argentina. *Anim. Reprod. Sci.* 102:322–327.
- Somfai, T., J. Noguchi, H. Kaneko, M. Nakai, y M. Ozawa. 2010. Production of good-quality porcine blastocysts by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 73:147–156.
- Somfai, T., K. Yoshioka, F. Tanihara, H. Kaneko, y J. Noguchi. 2014. Generation of Live Piglets from Cryopreserved Oocytes for the First Time Using a Defined System for In Vitro Embryo Production. *PLoS One.* 9:1–9.
- Tríbulo, A., D. Rogan, H. Tribulo, R. Tribulo, R. V Alasino, D. Beltramo, I. Bianco, R. J. Mapletoft, y G. A. Bó. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim. Reprod. Sci.* 129:7–13.
- Trokoudes, K. M., C. Pavlides, M. Sc y X. Zhang,. 2011. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertil. Steril.* 95:1996–2000.
- Wani, A. R., M. Z. Khan, K. A. Sofi, F. A. Lone, A. A. Malik, y F. A. Bhat. 2012. Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on in vitro maturation , fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Rumin. Res.* 106:160–164.
- Zárate Guevara, O. E. 2006. Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos. Tesis Maestría, Universidad Veracruzana. H. Veracruz, Veracruz.

