



---

---

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto de la criopreservación de ovocitos inmaduros  
sobre su maduración en cultivo en ratón hembra (*Mus  
musculus*) de la cepa CD-1.

Tesis que para obtener el título de  
BIÓLOGA

PRESENTA:  
ALMA ITZEL FERNANDEZ DIAZ

DIRECTORA:  
Dra. ROSALINA MARÍA DE LOURDES REYES LUNA

CODIRECTORA:  
M. en C. MONTSERRAT VAZQUEZ BALBUENA



JUNIO 2025

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Le agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por permitirme formar parte de esta casa de estudios y abrirme las puertas del conocimiento.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por las materias que dieron formación de mi como estudiante, por las experiencias y conocimiento aprendidos durante cada semestre.

A la Dra. Rosalina María de Lourdes, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, por su tiempo y esfuerzo, reactivos y material de laboratorio brindado para poder llevar a cabo este trabajo.

A la M.C. Montserrat Vázquez, por brindarme el apoyo como codirectora y maestra para poder terminar la tesis.

Agradezco la VIEP y al Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUAL) por el apoyo brindado con los animales que se me otorgaron para el proyecto.

A los revisores Dr. Jesús Ángel Tapia y Dra. Angélica Trujillo que se tomaron el tiempo de poder revisar la tesis y aconsejarme a mejorarla.

Y por último el conocimiento, las experiencias, crecimiento académico y personal otorgado en el laboratorio de Biología de la Reproducción.

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo en parte a las personas que han formado parte de esta etapa de mi vida y que me acompañaron en realizar este gran proyecto.

A mis padres por el cariño, paciencia y apoyo que me brindaron, sus regaños y valores que me enseñaron para poder dar lo mejor de mí.

Mis hermanos Juan Pablo e Ian por los momentos que me acompañaron en la carrera en cada proyecto o tarea que me impulsaban a realizar para nunca rendirme.

A mis abuelitos quienes me impulsaron a ser una gran persona y siempre compartir todo lo aprendido.

A mi tía Lolis quien siempre me impulso a estudiar la carrera, el apoyo en cada taller, curso, ponencia o presentación que tuviera, siendo mí ejemplo a seguir de nunca rendirme por lo que realmente me apasiona y ser feliz en la vida.

A los todos amigos que forme en la preparatoria, la universidad y becas que fueron piezas claves de mi formación para poder seguir los proyectos y metas que me proponía, cuando ni yo misma creía en mí, gracias por su apoyo, risas, tristezas, abrazos, chistes, estrés y experiencias en este camino.

A todas las maestras que me aconsejaron durante mi formación como estudiante y persona, Dra. Rosalina, por permitirme ser su tesista y ser parte del laboratorio, por el conocimiento otorgado para mi crecimiento personal y académico, Mtra. Monserrat por su tiempo, estimación y abrirme las puertas de su laboratorio y la Biól. Zaira por su apoyo en mi estancia en el laboratorio desde mi primer día hasta el último día, todas me brindaron la oportunidad de trabajar en temas que era desconocidos para mí, siempre teniendo paciencia conmigo al enseñarme y aprender.

Por último, gracias a la chica que nunca se rindió en terminar una carrera en ciencias biológicas pese a todas las adversidades que le puso la vida, que nunca olvide todo lo aprendido y que siempre trate de ser feliz.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DPBS: solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
- EG: Etilenglicol
- ES: Solución de equilibrio
- FIV: Fecundación *In Vitro*
- FSH: Hormona folículo estimulante
- G: Glicerol
- hCG: Gonadotropina coriónica humana
- hMG: Gonadotropina menopáusica humana
- HTF: Human Tubal Fluid
- LH: hormona luteinizante
- M: molar
- MII: Metafase II
- MIV: Maduración *In Vitro*
- OPU: Recolección de Óvulos
- SOPQ: Síndrome de Ovario Poliquístico
- TRA: Técnicas de Reproducción Asistida
- VS: Solución de vitrificación
- ZP: Zona Pelúcida

## Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>Marco teórico</b> .....	9
Espermatogénesis .....	9
Ovogénesis .....	10
Foliculogénesis.....	11
Estimulación hormonal.....	14
Ciclo estral .....	14
Fecundación .....	15
Fecundación in vitro .....	16
Infertilidad.....	18
Criopreservación .....	19
Técnica de vitrificación y desvitrificación .....	20
Crioprotectores.....	21
Desvitrificación por método Cryotech® .....	22
Maduración in vitro .....	22
<b>Antecedentes</b> .....	23
<b>Modelo biológico</b> .....	26
<b>Justificación</b> .....	26
<b>Objetivo General</b> .....	27
<b>Objetivos Particulares</b> .....	27
<b>Pregunta de investigación</b> .....	27
<b>Hipótesis</b> .....	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
<b>Esquema de trabajo</b> .....	29
<b>Obtención de ovocitos</b> .....	31
<b>Criopreservación</b> .....	32
<b>Obtención de espermatozoides</b> .....	33
<b>Desvitrificación y cultivo de los ovocitos</b> .....	34
<b>Fecundación <i>In Vitro</i></b> .....	35

<b>Análisis estadísticos</b> .....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	36
Efecto de la criopreservación de ovocitos inmaduros sobre su morfología .....	36
Efecto de la criopreservación de ovocitos inmaduros sobre su maduración en cultivo.....	39
Efecto de la criopreservación sobre la capacidad de fecundación de los ovocitos .....	40
<b>DISCUSIÓN</b> .....	41
<b>Perspectivas</b> .....	43
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	44
<b>ANEXOS</b> .....	45
<b>Medios y soluciones</b> .....	45
<b>LITERATURA REVISADA</b> .....	46

# RESUMEN

La fertilidad de los individuos se puede ver afectada notablemente por muchos factores endógenos y exógenos, e incluso patologías. Actualmente, los problemas de infertilidad se han visto en incremento a nivel mundial tanto en hombres como en mujeres. Por lo anterior, se ha recurrido al uso de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), dentro de las cuales se ha propuesto a la criopreservación de óvulos, tejido ovárico, espermatozoides y embriones como parte de la solución de esta problemática. Particularmente, la vitrificación de ovocitos ha adquirido recientemente una mayor importancia, ya que es una alternativa para postergar la fertilidad en el humano y en diversas especies, en especial las que se encuentran en peligro de extinción. En algunas situaciones no es posible tener ovocitos maduros (en metafase II) pero se cuenta con el ovario que contiene folículos en diferentes etapas de desarrollo y en su interior ovocitos. Por ello, el uso de medios de cultivo ha funcionado para lograr el ambiente adecuado para que células puedan crecer o sobrevivir por cierto tiempo. El medio HTF (Human Tubal Fluid) ha sido utilizados en diversos procedimientos de TRA para favorecer el desarrollo de células y embriones. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el impacto que puede causar la criopreservación de ovocitos inmaduros, posteriormente someterlos a desvitrificación y a su maduración en medio de cultivo HTF. Se utilizaron 34 ratones de la cepa CD-1 (20 hembras y 14 machos), se extrajeron los ovarios de las hembras para la obtención de los ovocitos inmaduros, mismos que se separaron en un total de 10 experimentos. El número total de ovocitos inmaduros obtenidos en cada uno se repartía en dos grupos (grupo control y grupo experimental). Las células del grupo control no se vitrificaron (231 células) y sólo se indujo su maduración en medio HTF, mientras que las del grupo experimental (129 células) fueron sometidas a criopreservación en crioviales para posteriormente ser desvitrificadas y llevarlas a su maduración en medio HTF, una vez que las células maduraron en medio de cultivo in vitro, se sometieron a un proceso de fecundación in vitro (FIV). Se encontró que en ambos grupos hubo un porcentaje de maduración similar (40% para grupo no vitrificado y 41 % para el grupo vitrificado), por lo que no

hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), *Prueba T Pareada*). Estos hallazgos son alentadores, pues sugieren que la criopreservación no tiene un impacto negativo en los ovocitos inmaduros, ya que estos pueden ser vitrificados, desvitrificados y lograr la maduración In Vitro usando medio HTF, para posteriormente someterlos a FIV, logrando que los ovocitos sean fecundados y ocurra el inicio del desarrollo embrionario.

# INTRODUCCIÓN

## **Marco teórico**

La reproducción es un proceso biológico que implica la unión de dos células reproductivas, un gameto masculino y un femenino, con el propósito de formar a un individuo y generar la descendencia genética de los progenitores. El proceso por el cual se forma los gametos femeninos y masculinos es denominada gametogénesis, en donde el óvulo y el espermatozoide estarán genotípica y fenotípicamente maduros y listos para participar en la fecundación (Comtet, et al.,2017). En el caso de los gametos masculinos el proceso de su formación se denomina espermatogénesis, por otro lado, en el caso de los gametos femeninos el proceso de su formación será la ovogénesis.

## Espermatogénesis

El sistema genital masculino consta principalmente de dos testículos, un sistema de conductos genitales que conectan a la uretra y una serie de glándulas accesorias. La espermatogénesis es un proceso que se lleva a cabo en el interior de los túbulos seminíferos de los testículos en donde las espermatogonias, por medio de meiosis, se diferenciarán en espermatozoides maduros (Hall et al., 2021). Este proceso se inicia en la etapa de la pubertad y continúa hasta edades avanzadas en el varón. Los espermatozoides, ya maduros, se liberan desde los túbulos seminíferos y son transportados hacia los epidídimos por medio de los conductos eferentes gracias a las contracciones musculares de los mismos conductos. Posteriormente, los espermatozoides tendrán una maduración bioquímica que les ayudara a adquirir la motilidad propia del espermatozoide, es decir una serie de cambios morfológicas y bioquímicos que conforme los espermatozoides recorren el túbulo epididimario les permitirá capacitarse para llevar la reacción acrosomal, siendo indispensable para que el espermatozoide pueda fecundar al ovulo homologo (Beltrán et al., 2016)., por otro lado, las glándulas accesorias aportarán el plasma seminal y los conductos

genitales serán los encargados del transporte de los espermatozoides durante la eyaculación (Hall et al ., 2021).

Las células espermáticas están formadas por la cabeza (que contiene al núcleo y el acrosoma), el cuello (rico en mitocondrias) y la pieza principal (cola o flagelo), la cual le permite el movimiento en el tracto genital femenino, en donde se llevará a cabo la capacitación espermática (Hall et al., 2021).

### Ovogénesis

El sistema genital femenino está conformado principalmente por los ovarios (que se encargan de la formación y maduración de los folículos y ovocitos), el oviducto o trompas de Falopio (quienes realizarán la captura y transporte del ovocito que es liberado por ovario y en el caso de llevarse a cabo la fecundación transportan al embrión en segmentación hacia el útero), el útero (salvaguarda al embrión durante toda la etapa prenatal hasta el nacimiento) y la vagina (donde se recibirán los espermatozoides durante el coito para llevar a cabo la fecundación) (Hall et al., 2021).

Durante el desarrollo de la mayoría de los vertebrados se forman dos ovarios, no obstante, existen especies que desarrollan una sola gónada como es el caso de las aves, reptiles. Los ovarios se encuentran en la parte inferior de la cavidad pélvica, debajo del útero o cuando se presenta un número par se ubican a un costado del útero (Morales Ledesma, 2015). En estas estructuras se lleva a cabo la ovogénesis.

La ovogénesis es el proceso por el cual las ovogonias, mediante la meiosis, se transforman en ovocito maduros. Este proceso inicia en el periodo prenatal. Una vez alcanzada la pubertad, dará comienzo el ciclo menstrual dentro del cual se llevará a cabo el proceso de ovulación. Este proceso se presenta de manera cíclica a lo largo de la vida de la hembra, finaliza en la menopausia y será regulado por

hormonas producidas en el ovario, hipotálamo y adenohipófisis. Particularmente hablando, la ovogénesis inicia partir de una ovogonia que forma a un ovocito primario, el cual se dividirá por meiosis que será interrumpida en profase I, será hasta la pubertad que esta célula progresará hacia ovocito secundario y la división meiótica será interrumpida en metafase II (MII) (Morales Ledesma, 2015).

El ovocito es madurado en el ovario y liberado durante la ovulación. Un ovocito con morfología normal presenta una forma esférica y el citoplasma homogéneo, la zona pelúcida (ZP) proporcionada y bien definida, el espacio perivitelino tiene zonas amplias; un ovocito normal y maduro presenta el primer corpúsculo polar bien definido y tiene un contenido homogéneo, estas son características que indican que el ovocito se encuentra en MII (Metafase II) (European Society of Human Reproduction and Embryology, 2016).

### Foliculogénesis

La foliculogénesis es el proceso de crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos en diferentes etapas, donde los ovocitos emergerán de los folículos formados durante la ovogénesis hasta que es ovulado o entra en atresia. Durante el desarrollo embrionario, las ovogonias suspenden su división meiótica y dan comienzo con la meiosis (Quintana & Young, 2014).

El folículo ovárico es el sitio donde se desarrollan y alcanzan su madurez los ovocitos, que están cubiertos de células epiteliales que forman una capa (capa de la granulosa) (Hall et al., 2021). Durante la niñez, las células de la granulosa en los folículos le proporcionan nutrientes al ovocito y secretan el factor de inhibición del ovocito, que lo mantiene en un estatus de ovocito primario, deteniendo la división meiótica. El proceso de la foliculogénesis (Hall et al., 2021) (fig.1) se divide en diferentes etapas:

➤ *Folículo primordial*: Están constituidos por un ovocito que se encuentra detenido en profase I de la meiosis y está rodeado por una sola capa de células epiteliales.

➤ *Folículo primario*: aquellos en los que las células de la granulosa (que rodean al óvulo) adquieren una forma cúbica y el folículo aumenta de tamaño.

➤ *Folículo secundario*: en esta etapa se forman varias capas de células alrededor del ovocito, el folículo aumenta de tamaño y las células de la granulosa segregan líquido folicular que forma un espacio entre ellas, lo que influye para la formación del antro folicular.

➤ *Folículo terciario o antral*: los folículos de esta fase se caracterizan porque presentan la cavidad del antro folicular, donde se expande y comienza la formación de la estructura llamada cúmulo oóforo, que es donde se encontrará al ovocito.

➤ *Folículo de Graaf*: El folículo está en etapa madura, el ovocito u óvulo se encuentra rodeado por el cúmulo oóforo y está listo para ser liberado cuando ocurra la ovulación.

La reserva folicular es clave para preservar la fertilidad y asegurar un desarrollo adecuado que con lleve a la ovulación (Palma, 2008).

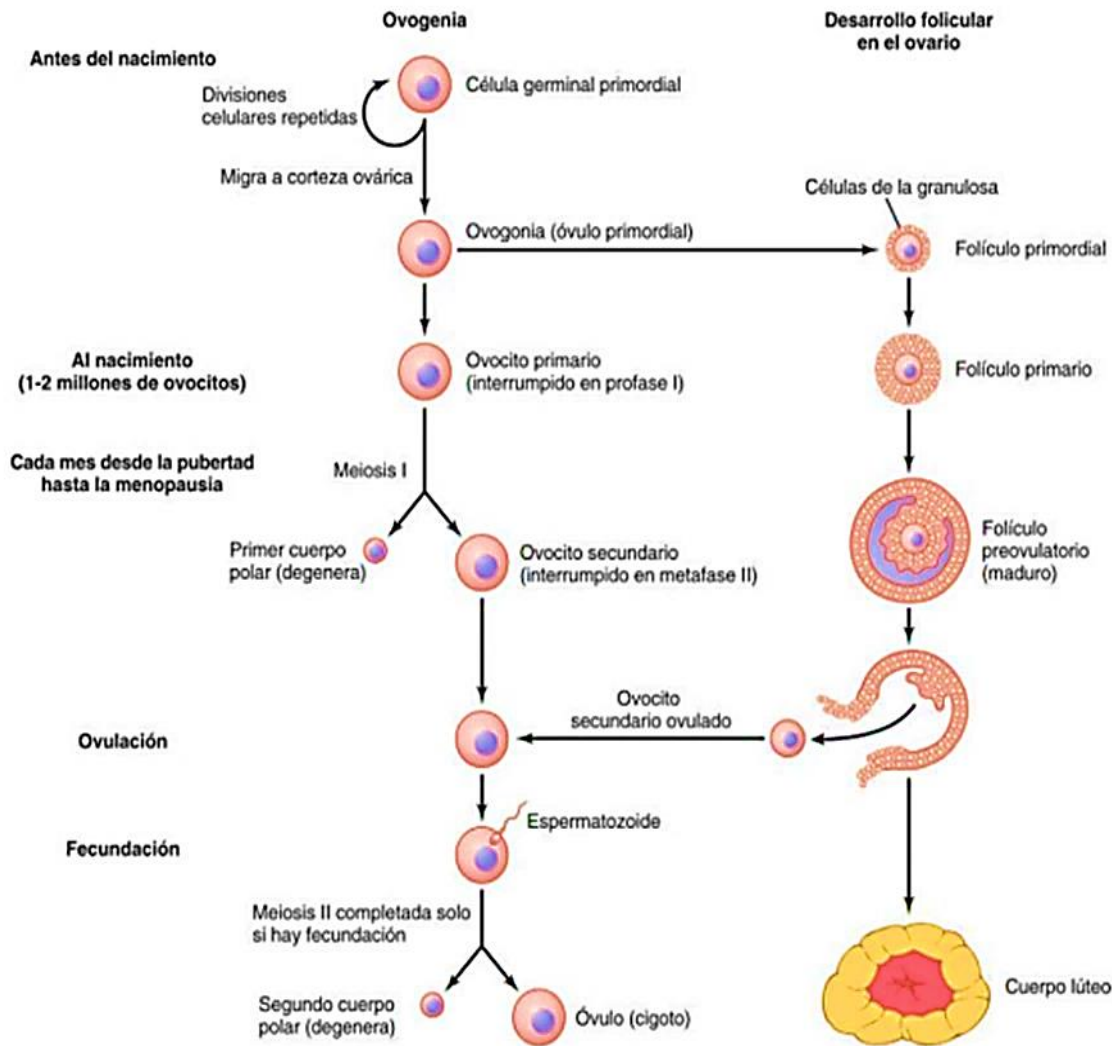


Figura 82-3. Ovogenia y desarrollo de los folículos.

Fig. 1. Ovogénesis y desarrollo de los folículos. Tomado de Hall, J. E., Guyton, A. C., & Hall, M. E. (2021).

Como ya se mencionó, la primera fase de la meiosis comienza durante el desarrollo fetal, pero se detiene en profase I y es hasta la pubertad donde se reactiva y ocurre la primera división meiótica del ovocito. Cada ovocito se divide en dos células hijas de 23 cromosomas cada una (llamadas ovocito secundario) y cuenta con la presencia del primer cuerpo polar, estos ovocitos pueden ser sometidos o no a una segunda división meiótica (donde el cuerpo polar se desintegrará en el citoplasma del ovocito). El óvulo lleva una segunda división meiótica posterior a la separación de las cromátidas hermanas pausándose en la meiosis, cuando el óvulo

es liberado mediante la ovulación es que tiene lugar la meiosis final (Hall et al., 2021).

### Estimulación hormonal

Las hormonas gonadotrópicas, la hormona estimuladora de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH), son secretadas por la hipófisis y estimulan la foliculogénesis y la producción ovárica de diversos esteroides. Al inicio de la pubertad la adenohipófisis inicia la secreción la FSH y LH en altas concentraciones al torrente sanguíneo. La FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos. La LH estimula la ovulación y prepara al útero para la implantación de un óvulo fecundado. Las variaciones hormonales de esta cascada afectan la morfología de los folículos ováricos (Trujillo, et al.,2015).

En las ratas a la mitad del ciclo reproductivo los folículos dominantes alcanzan su madurez, el estradiol producido por los ovarios ejerce un efecto crucial sobre la hipófisis elevando las concentraciones de LH, llevando a la ruptura del folículo y expulsión del ovocito (Trujillo, et al., 2015).

### Ciclo estral

El ciclo estral representa el ciclo biológico y fisiológico reproductivo de las hembras, se lleva a cabo de manera cíclica en muchos mamíferos e inicia en la pubertad (Izquierdo et al, 2014). En el caso de los ratones tiene una duración de 4 a 5 días y la fecundación ocurre en la parte superior del oviducto y al quinto día el embrión (en estado de blastocito) se implanta en la pared del útero (Mcmillan & Wynne, 1998).

Tanto los ratones como las ratas tienen un ciclo estral de 4 a 5 días de duración, aunque cada etapa puede durar un lapso diferente dependiendo de cada cepa. Este ciclo se compone de cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. La etapa del estro es la fase de receptividad sexual máxima. En esta fase, la hembra es receptiva para la cópula y la ovulación, ocurre dentro de las primeras 12-14 horas (Silver L., 1995).

La gestación en ratones dura en promedio entre 18 y 22 días, dependiendo del estado fisiológico, constitución genética de la cepa y número de crías que este gestando (Silver L., 1995).

### Fecundación

La fecundación es un proceso por el cual dos células sexuales se fusionan para crear un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos padres (Gilbert, S. F. 2005).

Gilbert (2005) propone que la fecundación lleva a cabo dos fines separados:

- a) La sexualidad (combinación de los genes derivados a partir de los dos padres )
- b) La reproducción (la creación de un nuevo organismo)

Si bien los detalles de la fecundación pueden variar entre las diferentes especies, el proceso de la concepción consta generalmente en cuatro eventos principales (Gilbert, S. F. 2005).

- 1) Contacto y reconocimiento entre el espermatozoide y el gameto femenino (En la mayoría parte de los casos esto asegura que el espermatozoide y el gameto femenino sean de la misma especie).
- 2) Regulación de la entrada del espermatozoide en el gameto femenino (solo un espermatozoide puede finalmente fecundar al gameto femenino)
- 3) Fusión del material genético del espermatozoide y del gameto femenino.
- 4) Activación del metabolismo del ovulo para dar comienzo al desarrollo.

En mamíferos los espermatozoides liberados durante la eyaculación son capaces de moverse, pero no de unirse y fecundar al gameto femenino (Gilbert, S. F. 2005). La vagina es quien recibe a los espermatozoides eyaculados, algunos seguirán su trayecto por el cérvix y otros serán expulsados; cuando alcanzan el útero los espermatozoides se capacitan gracias a los cambios morfológicos y bioquímicos (Gilbert, S. F. 2005) conformen recorre el túbulo epididimario y se activan dentro del

tracto genital femenino, en donde el más apto (es decir el que presente una morfología normal y motilidad adecuada) podrá unirse al óvulo y realizar la fecundación. Durante este periodo se retira una capa de glicoproteínas y proteínas del plasma seminal para que el espermatozoide pueda atravesar entre las células de la corona y se desarrolle la reacción acrosómica para permitir la fusión de ambos gametos (Beltrán et al., 2016).

La capacitación es el grupo de cambios fisiológicos por el cual el espermatozoide llega a ser competente para fecundar al gameto femenino (Gilbert, S. F. 2005). La capacitación puede ser imitada *In vitro* mediante la incubación de espermatozoides en medio de cultivo (conteniendo iones de calcio, bicarbonato y albúmina sérica) de tejido o fluido a partir de la trompa de Falopio. (Gilbert, S. F. 2005).

La reacción acrosómica (RA) se produce por la acción de enzimas que disuelven las capas protectoras del óvulo y actúan sobre la zona pelúcida (ZP) permitiendo que el espermatozoide la penetre. Cuando el espermatozoide entra en la ZP se adhiere al ovocito y sus membranas plasmáticas se fusionan, dando paso a la reacción cortical, donde se lleva a cabo la liberación de gránulos corticales que preparan al óvulo para dar paso al desarrollo embrionario (Hall et al ., 2021).

### Fecundación *in vitro*

La Fecundación *in vitro* (FIV) es el procedimiento por el que un ovocito y un espermatozoide se unen en una caja Petri en el laboratorio, sin el requerimiento del acto sexual (Gilbert, S. F. 2005).

Para que un tratamiento de FIV tenga éxito es necesario disponer de ovocitos viables y espermatozoides capacitados obtenidos de una muestra del donante masculino. Posteriormente, las dos células se depositan en un medio de cultivo controlado e incubado bajo condiciones óptimas, en donde uno de los espermatozoides penetrará al citoplasma del ovocito. Una vez realizada la fecundación se identifican los dos corpúsculos polares (CP) y los dos pronúcleos (PN, femenino y masculino), que se fusionarán para dar lugar al cigoto. Éste iniciará

las divisiones para desarrollar un embrión hasta la etapa de blastocisto, el cual será transferido al útero de la paciente para su implantación y posterior desarrollo del embarazo (Takeo et al. 2022).

El primer caso de FIV fue realizado en 1890 por Walter Heape (Mata et al.,2018). . El investigador llevó a cabo el primer trasplante de embriones de conejo Angora a una liebre belga, logrando el nacimiento de los conejos a buen término. En 1973, Carl Wood y John Leeton reportaron en Melbourne, Australia, el primer embarazo humano mediante la FIV (Mata et al.,2018). ; Sin embargo, no hubo progreso debido a la muerte temprana del embrión, esto llevo a desatar una polémica durante esa época sobre la trasferencia de embriones humanos y la técnica de FIV (Mata et al., 2018), (Larregle, M., & Young, P., 2021).

Pese a la crítica del momento, poco después Patrick Steptoe y Robert Edwards (Mata et al., 2018) retomaron la experimentación de FIV en humanos y fue entonces que en 1976 lograron el primer embarazo por medio de esta técnica, aunque fue un embarazo ectópico. Ellos continuaron con su trabajo de investigación al realizar un total de 102 pruebas de FIV fallidas, hasta lograr el éxito en 1978, con el nacimiento de Louise Joy Brown siendo la primera persona nacida por FIV (Mata et al., 2018). A partir de este momento se inició la investigación de todos los procesos que participan en la fecundación *in vitro* en mamíferos y del desarrollo de las técnicas de reproducción asistida.

En el 2010, Robert Edwards recibió el premio Nobel por sus aportaciones en el área de la medicina reproductiva ya que en la década de 1950 inició y desarrolló la técnica de FIV hasta que nació el primer bebé nacido por FIV dando paso a que Edwards y sus colaboradores perfeccionaron la técnica, dando como resultado que en el año de 1986 más de 1000 niños habían nacido mediante FIV (The Nobel Prize In Physiology Or Medicine, 2010).

## Infertilidad

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad en el humano se define como la presencia de una patología en el aparato reproductor que hace imposible un embarazo. Existen dos tipos de infertilidad, la primaria y la secundaria. La primaria consiste en la incapacidad de concebir un embarazo después de un año de relaciones sexuales continuas sin el uso de un método anticonceptivo (Rojas et al., 2011). La secundaria se presenta en parejas que después de haber logrado un embarazo pierden la capacidad de lograrlo nuevamente (OMS, 2019).

Dentro de una pareja, la infertilidad puede deberse a diversos factores internos o externos como la edad, la fisiología y salud del paciente, la presencia de contaminantes ambientales, enfermedades hereditarias, consumo de alcohol o tabaquismo, etc. Estos causales pueden presentarse tanto en el hombre como en la mujer o en ambos, además de la infertilidad idiopática (OMS, 2019). Por otro lado, la población femenina también ha presentado problemas de infertilidad o la necesidad de postergar la maternidad, por lo que optan por usar TRA como alternativas ante esta problemática.

La OMS estima que al menos un 17.5% de la población mundial sufre de infertilidad, esto representa que una de cada seis personas presenta este problema de salud; la prevalencia varía poco entre las diferentes regiones y las tasas son similares en los países de ingresos altos, medianos y bajos, lo cual demuestra que la infertilidad es un problema de salud pública en todos los países del mundo (OMS, 2019).

En el caso de los humanos, cuando se presentan situaciones de infertilidad puede optar por someterse a una TRA con el fin de poder tener un bebé, tal es el caso de la FIV. No obstante, la problemática de la infertilidad se ha observado en diversas especies de mamíferos como son los rinocerontes. Se considera que las TRA pueden ser beneficiosas para superar los problemas de infertilidad y aumentar

la diversidad genética, específicamente en la familia Rhinocerotidae. Se tiene registro de procedimientos de TRA en diferentes especies de rinocerontes, donde se llevó a cabo la recolección y criopreservación de semen, así como la inseminación artificial (IA) (Hildebrandt et al., 2023). Recientemente para el Rinoceronte Blanco del Sur (*Ceratotherium simum simum*) se ha implementado la recolección de óvulos (OPU) combinada con la maduración *in vitro* (MIV), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) , el cultivo y criopreservación de embriones para la generación exitosa de blastocitos *in vitro* y la generación de células madre embrionarias (Hildebrandt et al., 2018).

Actualmente, en México se estima que al menos 291 especies mamíferas están en riesgo (PROFEPA, s.f.), principalmente debido a factores como la contaminación ambiental (Feng & Chen, 2024). Por ello, es fundamental estudiar la viabilidad del uso de las TRA para abordar esta problemática y buscar soluciones que puedan ayudar tanto a los humanos como a la conservación de las especies más vulnerables.

### Criopreservación

La criopreservación de gametos es una Técnica de Reproducción Asistida que en el humano es utilizada para la preservación de la fertilidad y como parte de los tratamientos de la infertilidad. En las pacientes que sufren problemas de fertilidad se puede realizar el almacenamiento de los ovocitos por criopreservación después de ser inducidas hormonalmente, y en especial en aquellas mujeres que tienen una baja respuesta a la inducción de la ovulación, en donde la acumulación y almacenamiento de ovocitos maduros (en metafase II) provenientes de 2 ó 3 ciclos de estimulación aumentan la probabilidad de éxito en el desarrollo de un embrión, así como la capacidad de selección embrionaria y gestación (Vajta & Yovich, 2008).

La criopreservación es considerada como una de las TRA. A mediados de siglo pasado la criobiología de la reproducción en mamíferos tuvo desarrollo

primeramente para los espermatozoides, después se empleó para los embriones y por último en ovocitos (Vajta & Yovich, 2008).

### Técnica de vitrificación y desvitrificación

La vitrificación es una técnica implementada en tratamientos de infertilidad y estrategias de preservación de la fertilidad, con el fin de conservar las células con crioprotectores al almacenarlas a temperaturas bajas (nitrógeno líquido  $-196^{\circ}\text{C}$ ), sin afectar su viabilidad y con un almacenamiento indefinido (Remohí Giménez et al., 2013). La vitrificación es una técnica de criopreservación cuyo uso está incrementando en comparación con las técnicas de congelación (Vajta & Yovich, 2008). La vitrificación se usó en el ámbito de la embriología una década posterior a la congelación lenta, consecuente al deterioro que ocasionaba esta técnica a las células: formación de cristales, daño por enfriamiento, lesiones osmóticas, etc.

Las técnicas de vitrificación se dividen en rápidas y ultrarrápidas. La vitrificación rápida se vincula a la suspensión regular de las células en vapores de nitrógeno líquido (a una temperatura aproximada de  $-80^{\circ}\text{C}$ ), en donde la temperatura pasa de  $37^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente a  $-196^{\circ}\text{C}$  en una fracción de tiempo muy corta. En cuanto a la vitrificación ultrarrápida ésta consiste en someter a las células a un cambio de temperatura drástico de  $37^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  (para su almacenamiento) de manera extremadamente rápida, a una velocidad de alrededor de los  $15\ 000\text{-}30\ 000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Liebermann et al., 2002). Es decir, que la célula se congela en contacto con el nitrógeno líquido en un segundo, lo que es equivalente a un descenso de temperatura de entre  $250^{\circ}\text{C}$  y  $500^{\circ}\text{C}$  por segundo. Sin embargo, el tamaño, la forma, la permeabilidad y otros factores inciden en la supervivencia de la célula al proceso de criopreservación. Al someterlas a temperaturas bajas, las células requieren del uso de crioprotectores para prevenir la formación de hielo intracelular por el cambio de temperatura mediante la deshidratación de la célula (García et al., 2009).

Por lo que la demostración de la viabilidad de la vitrificación implementó el desarrollo de diferentes técnicas de vitrificación ultrarrápida como OPS (*open pulled straws*), *Cryoloop*, Crioviales o Criotubos, TMG (Método de gota de mínimo tamaño) o MVC (*enfriamiento de mínimo de volumen*) y Cryotop. Este último método fue desarrollado por Kuwayama y colaboradores e implicó una versión sofisticada del procedimiento mediante los *cryotop*, siendo unas de las más eficientes hoy en día (Vajta & Yovich, 2008). El método de cryotop radica en emplear una varilla de plástico unida a una película de plástico con un tampón protector para la muestra evitando daños a la misma durante el plazo del almacenamiento, donde los embriones u ovocitos previamente cubiertos con agentes crioprotectores son depositados sobre la película plastificada con un mínimo de volumen, para ser almacenados en un tanque con nitrógeno líquido.

### Crioprotectores

Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles que modifican las propiedades fisicoquímicas de las soluciones líquidas presentes en los seres vivos. No obstante, sus funciones principales son promover una rápida deshidratación celular y amortiguar el efecto de la alta concentración de solutos en el interior de la célula (Chian et al., 2004). La estructura química y el efecto biológico de estos compuestos crioprotectores son diversos, están formados por moléculas sencillas y complejas, como las proteínas anticongelantes sintetizadas (Vajta & Yovich, 2008).

Los crioprotectores son categorizados como permeables y no permeables. Los crioprotectores permeables se caracterizan por ser de bajo peso molecular, pueden atravesar la membrana plasmática y su función es reemplazar el volumen de agua intracelular, para evitar daños en la célula por la formación de cristales de hielo durante la congelación (Vajta & Yovich, 2008). Algunos ejemplos son el glicerol (G), el etilenglicol (EG) y el dimetilsulfóxido (DMSO). Por otro lado, los crioprotectores no permeables son de alto peso molecular por lo que no pueden

ingresar a la célula, su papel es causar una rápida deshidratación celular mediante ósmosis con el fin de aumentar la viscosidad de la membrana (Boiso, 2001). Ejemplos de este grupo son la trehalosa, la sacarosa y la lactosa. En el presente trabajo se utilizó una mezcla de crioprotectores, consistente en sacarosa (no permeable) y etilenglicol (permeable).

La sacarosa es un agente crioprotector no permeable efectivo a alta cantidades de congelación (Ávila et al., s. f.), por otro lado, el etilenglicol (EG) se ha utilizado mucho en la vitrificación de ovocitos humanos y embriones porque tiene un bajo peso molecular, lo que le permite penetrar fácilmente en las células, además de ser menos tóxico. Esto lo hace una opción efectiva y segura para preservar las células. (Chian et al., 2004)

#### Desvitrificación por método Cryotech®

El método de desvitrificación consiste en el descongelamiento del material biológico (células o tejido) que han sido almacenados en temperaturas bajas (-196°C) en nitrógeno líquido. El método de Cryotech® utiliza soluciones de desvitrificación atemperadas entre 25-27 °C, para la recuperación de los ovocitos o embriones posterior a su vitrificación. Consta de una solución de desvitrificación o descongelación (sacarosa 0.5 M), Solución de dilución (sacarosa al 0.1 M) y solución de lavado. Llevando los cryotops a las placas de desvitrificado de manera rápida, se sumerge en el primer pozo de solución de desvitrificación, visualizando los ovocitos en un primer pozo durante 1 min en sacarosa 0.5M, posteriormente el ovocito se pasará a un segundo pozo con sacarosa al 0.1 M por un lapso de 3 min., y será llevado a un pozo de solución de lavado (Kuwayama et al., 2010). Llevando los ovocitos recuperados a una placa de cultivo para evaluar su supervivencia.

#### Maduración *in vitro*

La maduración *in vitro* (IVM) es una técnica implementada en el desarrollo y crecimiento del ovocito, donde se promueve la capacidad del ovocito de sustentar

el desarrollo del embrión (Coticchio et al., 2015). Se recomienda para pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOPQ), hiperestimulación ovárica o aquellas que no desean la estimulación ovárica (Remohí Giménez et al., 2013). Dentro de las ventajas de esta técnica es la seguridad del paciente y reducción de costos.

Cuando el ovocito entra en meiosis, se detiene en la profase de la primera división meiótica. Inicialmente esta obstrucción es provocada por factores particulares del ovocito, los cuales se mantienen gracias a factores aportados por procesos intercelulares comunicantes. De tal manera que la maduración nuclear no ocurra hasta que se haya producido la maduración citoplasmática (Remohí Giménez et al., 2013). La técnica IVM consiste en la recuperación de ovocitos inmaduros de los folículos antrales ováricos no estimulados y su cultivo en un medio apropiado (pH 7.2 - 7.3) para llevarlos a su maduración, todo esto en un ambiente estéril y a una temperatura de 37 °C (Remohí Giménez et al., 2013).

### **Antecedentes**

En área de la criopreservación, cada día se investigan nuevas técnicas y crioprotectores que aumenten las tasas de recuperación de ovocitos, espermatozoides y embriones viables después de ser sometidos a la criopreservación para disminuir el daño criogénico a las células.

El progreso en los métodos de criopreservación en la embriología de diversos animales mamíferos no ha sido lineal. Inicialmente, en 1972, Whittingham y colaboradores (Vajta & Yovich, 2008) realizaron la congelación de embriones de ratón, posteriormente en 1977 este grupo realizó por primera vez la congelación de ovocitos en ratón. (Vajta & Yovich, 2008). Para 1983, Trounson y Mohr realizaron la congelación de embriones humanos (Vajta & Yovich, 2008), llevando a Rall y Fahy, en 1985 (Vajta & Yovich, 2008), a cambiar el método de congelación para la vitrificación de embriones de ratón. Después, en 1989, Nakagata realizó la vitrificación de ovocitos de ratón. Por lo que los antecedentes llevaron a Kuwayama

y colaboradores, en 2005, a realizar la vitrificación de embriones y ovocitos a gran escala (Vajta & Yovich, 2008).

Esto llevo a la propuesta de diversos sistemas de clasificación, aunque ninguno de ellos fue satisfactorio en su totalidad, ya que produjo categorías basadas en distintos rangos, como la distribución de los compuestos crioprotectores (equilibrio o no equilibrio), la velocidad de enfriamiento (enfriamiento lento, rápido o muy rápido ) o el mecanismo de solidificación de la solución que contiene la muestra biológica(congelación o vitrificación) (Vajta & Yovich, 2008).

Con base en la técnica de vitrificación, el Dr. Masashige Kuwayama (Kuwayama et al., 2005) desarrolló el método Cryotech que consiste en el uso de un recipiente de polipropileno, unido a un mango de plástico, que dispone de un agente crioprotector para proteger a las muestras durante el almacenamiento a temperaturas bajas. En el proceso de vitrificación las células no sufren la formación de cristales gracias a los agentes protectores. Gracias a este método, Kuwayama ha vitrificado embriones y ovocitos y después de la desvitrificación ha logrado obtener hasta un 91% de recuperación de óvulos y embriones viables (Kuwayama et al., 2005).

Es muy importante resaltar que en la literatura reportada los trabajos se han enfocado en la criopreservación de ovocitos maduros o de embriones, pero no en la evaluación de la viabilidad de ovocitos inmaduros criopreservados. Así, por ejemplo, Sirait et al. (2022) mencionan que la FIV de ovocitos previamente vitrificados en humanos han tenido resultados positivos en el aumento de la tasa de supervivencia de los ovocitos desvitrificados, la tasa de fecundación y embarazos clínicos en buen término; a pesar de ello existen limitaciones en la criopreservación de ovocitos maduros en pacientes con cáncer. Los protocolos conllevan una estimulación ovárica que involucra la administración de hormona liberadora de gonadotropinas, que son causantes de retraso en las terapias en contra del cáncer, es por ello que se debe considerar la vitrificación de ovocitos inmaduros como una

opción. Estos autores señalan que se tiene bien estandarizado el procedimiento de vitrificación de ovocitos maduros y embriones; sin embargo, la vitrificación de ovocitos inmaduros sigue siendo discutible debido a su baja tasa de maduración y fecundación *in vitro* posterior a la desvitrificación.

En el mismo ámbito, Veeck et al. (1983) desarrollaron un proyecto en el cual utilizaron ovocitos de humano en diferentes etapas de madurez, en donde se estimuló a los folículos por medio de gonadotropina menopáusica humana (hMG), gonadotropina coriónica humana (hCG) y FSH y se obtuvieron 74 ovocitos inmaduros (con base en las características morfológicas de los ovocitos). Después de periodos de incubación de 22-35 horas en medio de cultivo Ham's F-10, los ovocitos fueron inseminados con espermatozoides para su FIV teniendo como resultado 44 ovocitos fecundados y transferidos en 30 pacientes, pero logrando solamente 8 embarazos. (Veeck et al. 1983)

Por otra parte, Seki et al. (2023) realizaron estudios sobre la criopreservación ultrarrápida de embriones de ratas en todas las etapas de desarrollo y mediante un procedimiento de vitrificación de pequeño volumen realizaron su almacenamiento eficaz en criotubos (también conocidos como crioviales), lo que justifica su uso ya que un método de almacenamiento alternativo, los cryotops, son dispositivos con un precio elevado en comparación de los criotubos. Así mismo, el cryotop sólo permite criopreservar un bajo número de embriones u ovocitos (5-10 embriones) mientras que en los crioviales es posible almacenar entre 20-100 embriones (Seki et al., 2023).

Khalili et al. (2017) señalan que los avances recientes en TRA han sido beneficiosas, logrando el desarrollo y nacimientos en humanos mediante la combinación de las TRA (MIV y la vitrificación de ovocitos). Aunque la vitrificación de ovocitos maduros *in vivo* sigue siendo una de las técnicas más efectivas en la actualidad, el uso de ovocitos inmaduros sometidos a Criopreservación y su posterior MIV se ha convertido en una estrategia clave para la preservación de la

fertilidad, especialmente en pacientes con patologías, tratamientos oncológicos, síndrome de ovario poliquístico (SOP), entre otros.

Gracias a diversos trabajos e investigaciones en humanos y animales relacionados con las TRA, se ha logrado ofrecer soluciones eficientes ante diferentes problemáticas e incógnitas, brindando estrategias a mujeres y especies animales que desean conservar su capacidad reproductiva.

### **Modelo biológico**

Para este proyecto se utilizó el modelo experimental del ratón (*Mus musculus*) de la cepa CD-1. Este modelo es excelente por ser un animal poliovulante y porque el ciclo estral en los ratones, al igual que en muchos mamíferos, presenta cambios cíclicos en la actividad reproductiva de las hembras (Izquierdo et al., 2014).

### **Justificación**

Actualmente las mujeres han logrado desarrollarse de manera profesional y por ello han decidido postergar la maternidad, mientras que otras han presentado problemas para poder quedar embarazadas, debido a factores endógenos o exógenos. De igual manera, en varias especies de animales se ha visto afectada su fertilidad, he incluso ha llevado a la extinción de diversas especies, principalmente aquellas que son vulnerables a los efectos del cambio climático (Bizarro N., et al., 2018), donde se ha demostrado que puede afectar el desarrollo y la calidad de óvulos y espermatozoides.

En las técnicas de reproducción asistida para pacientes que presentan infertilidad o de pacientes que por alguna razón desean preservar sus ovocitos, durante la aspiración de los ovocitos es posible recuperar ovocitos inmaduros de pacientes que serán sometidas a una Fecundación *in vitro* (FIV) o a una microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En el caso de animales que sufrieron algún accidente o que se encuentren en peligro de extinción,

se pueden recuperar los ovarios y todos los ovocitos que se encuentran en diferentes estados de maduración, para su posterior uso en una TRA. En estos casos, es deseable criopreservar los ovocitos inmaduros y madurarlos en cultivo posteriormente.

La criopreservación es una técnica que se ha utilizado con el fin de preservar la viabilidad de diversos tipos de células, por este motivo en el presente proyecto se tuvo como objetivo determinar si la vitrificación y posterior desvitrificación de ovocitos inmaduros afectan su capacidad de madurar en medio de cultivo HTF y capacidad de fecundación en el proceso de FIV.

### **Objetivo General**

Estudiar el efecto de la criopreservación de ovocitos inmaduros, obtenidos de ratones de la cepa CD-1, sobre su maduración en cultivo y uso en FIV.

### **Objetivos Particulares**

1. Estudiar el efecto de la criopreservación por vitrificación ultrarrápida de ovocitos inmaduros sobre su morfología, en ratones hembra adultas de la cepa CD-1.
2. Estudiar el efecto de la criopreservación por vitrificación ultrarrápida de ovocitos inmaduros sobre su maduración (MII) en cultivo, en ratones hembra adultas de la cepa CD-1.
3. Determinar si el proceso de criopreservación afecta la capacidad de los ovocitos a ser fecundados por medio de la técnica *in vitro*.

### **Pregunta de investigación**

¿Es posible madurar en cultivo ovocitos inmaduros que fueron criopreservados por la técnica de vitrificación ultrarrápida y posteriormente fecundarlos *in vitro*?

## **Hipótesis**

Someter a la criopreservación por vitrificación ultrarrápida a ovocitos inmaduros de ratones hembra no afecta su maduración en medio de cultivo HTF ni su capacidad de ser fecundados *in vitro*.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP.

## **Esquema de trabajo**

Para el desarrollo del proyecto se realizaron 10 experimentos, en cada uno se utilizaron 2 ratones hembra y 1 macho de la cepa CD-1, ambos de 10 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio con acceso libre al agua y al alimento. Los experimentos se ajustaron a la NOM-062-ZOO-1999 para el uso y cuidado de animales de laboratorio para experimentación.

El diseño experimental que se realizó se ilustra en el siguiente diagrama de trabajo:

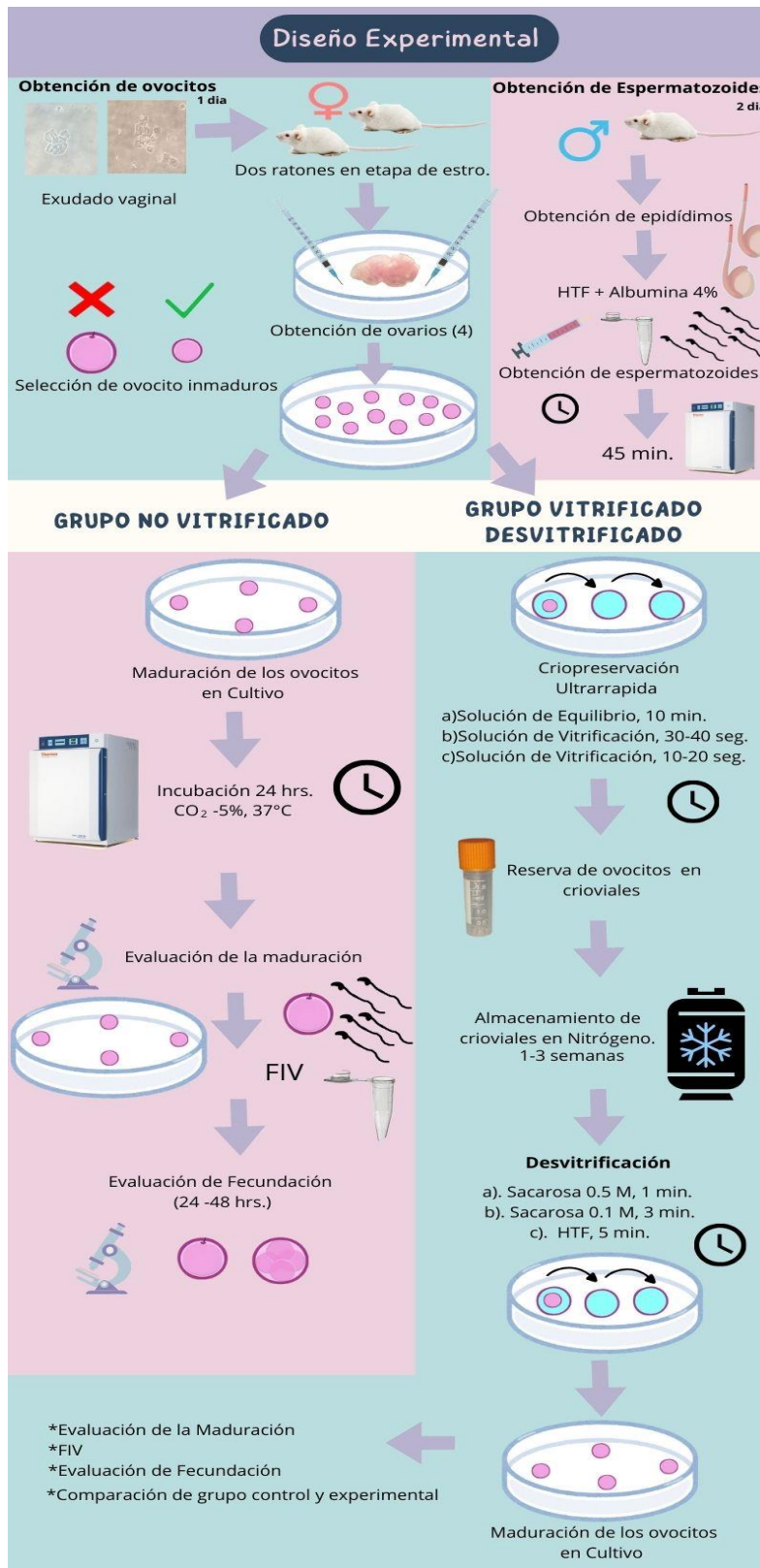


Fig. 2 Diagrama de trabajo del diseño experimental en grupo control (no vitrificado) y experimental (vitrificado).

## Obtención de ovocitos

Para la obtención de ovocitos, en cada experimento se realizó un frotis vaginal a las ratonas hembras, las muestras se observaron en un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon) para reconocer la citología de las células e identificar cuáles hembras presentaban la etapa de estro (Fig.3).

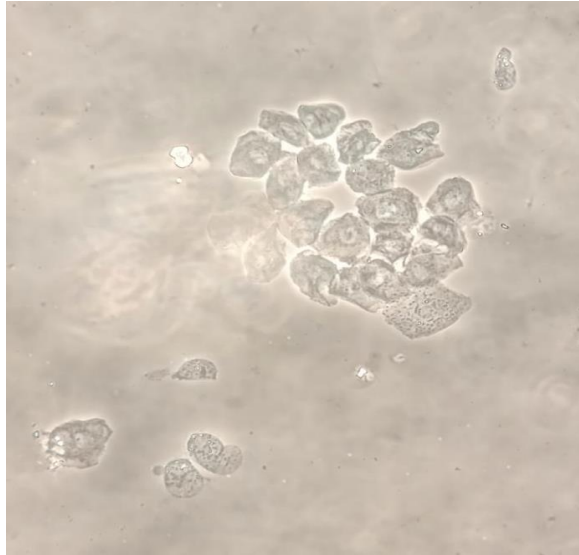


Fig.3 Etapa de estro observado en microscopio *NIKON* invertido a 40X.

En cada experimento se sacrificaron 2 hembras en etapa de estro, usando una cámara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Posteriormente se realizó una pequeña incisión abdominal en las ratonas para localizar los ovarios, al ubicarlos se diseccionaron junto con el oviducto y eso permitió separarlos de los cuernos uterinos (fig.2). Inmediatamente los tejidos fueron colocados en una caja Petri con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), que es una solución que se utiliza para cultivar y manipular células de mamíferos. Este medio permitió limpiarlos de sangre y retirar el exceso de grasas, consecutivamente los ovarios se colocaron en medio HTF (*human tubal fluid*) para la recuperación de los ovocitos bajo un microscopio estereoscópico. Para ello, se separaron los ovarios del oviducto, con el uso de dos agujas de insulina, el tejido del ovario se fraccionó y se recuperaron los ovocitos inmaduros liberados de los folículos antrales.

El número total de ovocitos obtenidos de ambas hembras se dividieron en dos grupos, con un grupo se realizó el control y el segundo grupo fue el experimental. Las células del grupo control no se vitrificaron y sólo se indujo su maduración en placas de medio de cultivo HTF, mientras que las del grupo experimental fueron sometidas a criopreservación y desvitrificación. Ambos grupos fueron inducidos a su maduración en medio HTF y cuando las células ya habían madurado se usaron en un procedimiento de fecundación *in vitro* (FIV).

Los ovocitos inmaduros que no se vitrificaron (grupo. control) fueron adicionados dentro de microgotas de 80 µl de medio HTF cubiertas con aceite mineral en una caja Petri y se incubaron a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> y ambiente húmedo por 24 a 48 hrs hasta observar que se encontraron en etapa de metafase II (liberación del primer cuerpo polar).

### **Criopreservación**

La criopreservación de los ovocitos inmaduros del grupo experimental se llevó a cabo por vitrificación ultrarrápida, para ello se usó la metodología de Cryotech (Kuwayama, 2007), un protocolo que se ha unificado para ovocitos y embriones en todos los estadios de desarrollo. Para realizar este procedimiento se usaron las siguientes soluciones: 1) solución de equilibrio (ES) Etilenglicol 15%, 2) solución de vitrificación (VS1) Etilenglicol 15%, y 3) sacarosa 0.5 M (VS2) como agente crioprotector; todas las soluciones se mantuvieron a una temperatura de 37°C (Chian et al., 2004).

Se hizo una adaptación al método propuesto por Kuwayama y cols., por lo que se usó una caja Petri estéril (7.0 cm de diámetro), como placa de vitrificación. Con ayuda de una micropipeta, con punta estéril, se aspiraron los ovocitos junto con un poco de medio HTF y se colocaron en la microgota (100µl) de la solución ES durante 10 min, al terminar el tiempo se pasaron inmediatamente a la primera microgota

(100 $\mu$ l) de solución VS1 por 30 seg y después se transfirieron a una nueva microgota (100 $\mu$ l) de VS2 por 20 seg (Fig. 4).

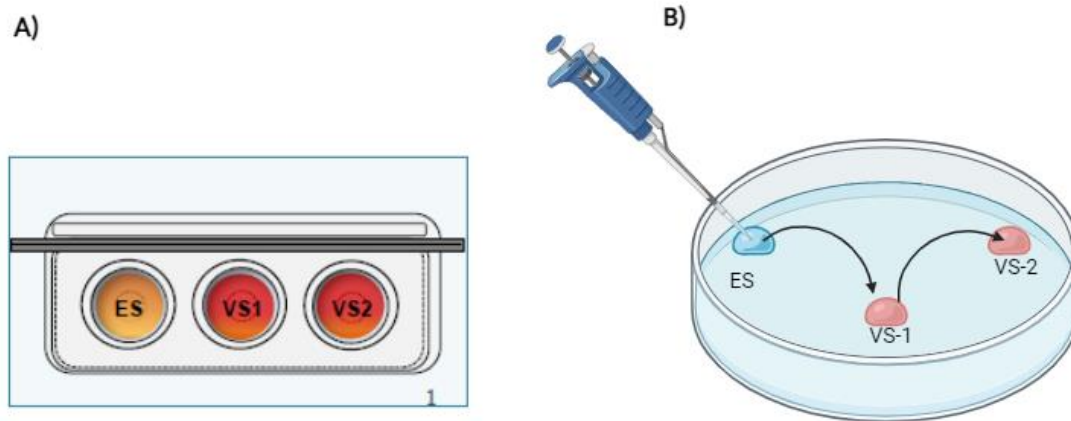


Fig. 4. Placa de vitrificación que se usa en el método de almacenaje Cryotech (A) y modificación al método, aplicada en este proyecto (B). Tomado del Manual de uso de Cryotech© (panel A) y elaboración propia (panel B). Created in <https://BioRender.com>

Finalmente, el número total de ovocitos recuperados después del procedimiento se dividieron en 3 crioviales estériles, previamente etiquetados y sumergidos en nitrógeno líquido, se colocaron en el interior con un volumen mínimo de solución VS. Posteriormente se tapó el criovial y se procedió a almacenarlos en un tanque de nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L), a -196 °C.

### **Obtención de espermatozoides**

Para la obtención de los espermatozoides que se usaron en la FIV, se sacrificó un macho adulto mediante asfixia en cámara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Después se realizó una pequeña incisión abdominal en el ratón para localizar los dos testículos y los epidídimos, se identificó la cola del epidídimo y el conducto deferente, se separaron y se usaron para obtener los espermatozoides al inyectar 1 ml de medio HTF adicionado con albúmina al 4% por el conducto deferente. Posteriormente se realizó una incisión en la cola del epidídimo, por donde salieron los espermatozoides.

Las células obtenidas se incubaron en un tubo cónico, a 37 °C en una atmósfera de aire y CO<sub>2</sub> al 5% durante 45 minutos, adicionado con 1 ml de medio HTF y albúmina al 4% para mantener su viabilidad y posteriormente usarlos para realizar la FIV.

### **Desvitrificación y cultivo de los ovocitos**

Después de un periodo de almacenamiento de 1-3 semanas en N<sub>2</sub>L, los ovocitos inmaduros se desvitrificaron. Para ello, se procedió a retirar el criovial del tanque de N<sub>2</sub>L, bajo un microscopio estereoscópico a 40 X se recuperó la gota de medio con los ovocitos y se pasó a 37°C. Una vez descongeladas las células, se transfirieron a una caja Petri en los siguientes tiempos y soluciones, atemperadas a 37°C: a) 1 minuto en sacarosa 0.5 M, b) 3 minutos en sacarosa 0.1 M y c) 10 minutos en medio de incubación HTF.

Posteriormente, los ovocitos se pasaron a una microgota de medio HTF en una caja de medio de cultivo, se incubaron a 37°C en atmósfera de aire y CO<sub>2</sub> al 5% por 24 hrs o hasta observar la maduración del ovocito (Metafase II, MII), es decir cuando presentó el primer corpúsculo polar. Después de este tiempo se analizó la morfología de las células para realizar una fecundación *in vitro* en el grupo experimental.

La morfología óptima del ovocito es subjetiva ante quien lo observa, sin embargo, en base con los criterios tomados de Singh et al., (2023), la morfología normal de un ovocito se caracteriza por un citoplasma claro, un cuerpo polar único, un grosor adecuado de la zona pelúcida, un espacio perivitelino adecuado y una capacidad intrínseca de los ovocitos para experimentar una maduración meiótica y una fecundación normal.

## **Fecundación *In Vitro***

A los ovocitos del grupo no vitrificado (control) que se encontraron en MII después de su cultivo se utilizaron para una fecundación *in vitro*. Para realizar este procedimiento, en una caja Petri con 4 microgotas del medio HTF (80  $\mu$ l) y cubiertas con aceite mineral atemperado a 37 °C se colocaron en cada microgota 3-4 ovocitos y 50,000 espermatozoides. Después de añadirlos, se continuaron incubando bajo las mismas condiciones y periódicamente se revisaron bajo un microscopio invertido a 40 X hasta observar la formación de los pronúcleos (masculino y femenino) y posteriormente las primeras dos divisiones celulares embrionarias. Estos criterios se utilizaron para determinar cuáles ovocitos si fueron fecundados, por lo que se dio inicio al desarrollo embrionario (Fig. 2).

Después de la maduración en cultivo de los ovocitos criopreservados, se sometieron a un procedimiento de fecundación *in vitro* bajo la misma metodología que se describió para el grupo control.

## **Análisis estadísticos**

Para analizar los resultados que se obtuvieron se realizó una prueba *t* pareada para comparar las medias aritméticas del porcentaje de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario del grupo no vitrificado con el grupo vitrificado. Previamente a ese análisis se realizó una prueba Shapiro-Wilk test para revisar la normalidad de la distribución probabilística de los datos de cada grupo, misma que indicó que éstos se ajustaban a la distribución normal ( $p > 0.05$ ).

La significancia de los resultados de la prueba t-Student se determinó con base en un valor alfa de 0.05 para todas las pruebas y se usó el paquete estadístico GraphPad Prism Demo versión 8.00 para Windows.

## RESULTADOS

Se tomaron los pesos de los ratones y se obtuvo que las hembras presentaron un peso promedio de  $36.5 \pm 2.24$  gr y los machos presentaron un peso medio de  $38.7 \pm 1.56$  gr.

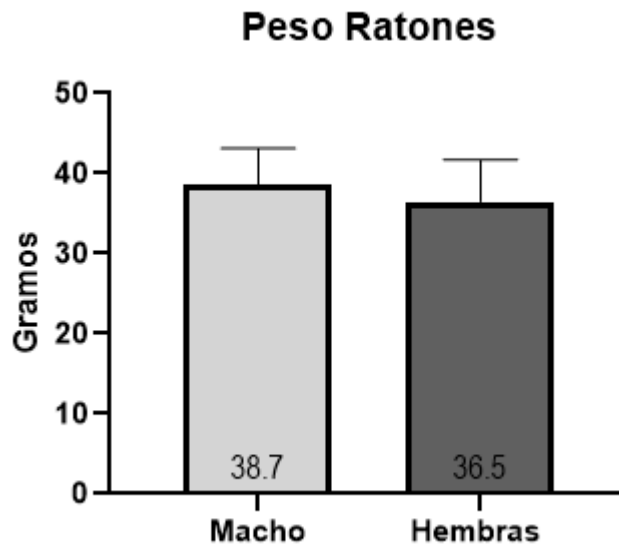


Fig. 4. Promedio de pesos de los ratones macho y hembras previo a su sacrificio.

### Efecto de la criopreservación de ovocitos inmaduros sobre su morfología

De los diez experimentos realizados, se recuperaron un total de 360 ovocitos, los cuales fueron distribuidos en dos grupos: el grupo no vitrificado, compuesto por ovocitos inmaduros que se sometieron directamente a maduración con medio HTF y posteriormente a fecundación in vitro (FIV), y el grupo vitrificado, formado por ovocitos inmaduros que pasaron por un proceso de criopreservación mediante vitrificación ultrarrápida, desvitrificación, maduración con medio HTF y posteriormente FIV. Al analizar la morfología de los ovocitos, se encontró que el porcentaje de ovocitos con morfología normal fue similar en ambos grupos: 40% en los no vitrificados y 41% en los vitrificados, lo que sugiere que la vitrificación


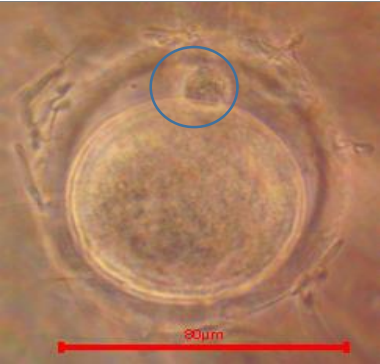
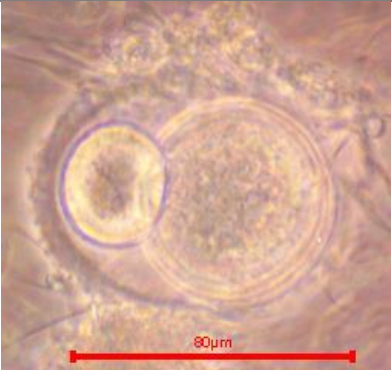
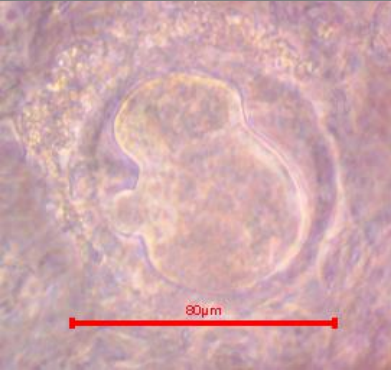

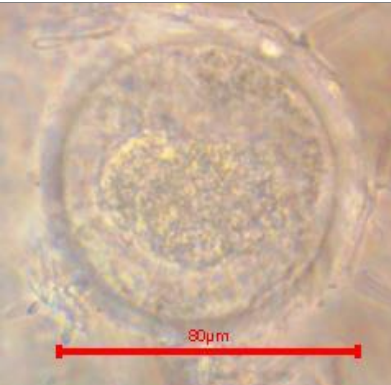
ultrarrápida no afectó significativamente la morfología de los ovocitos inmaduros (Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación de la morfología de los ovocitos de ambos grupos de trabajo.

<b>MORFOLOGÍA</b>			
<b>Grupos</b>	<b>Anormal</b>	<b>Normal</b>	
Vitrificado (n=129)	59% (n= 76)	41% (n=53)	Desarrollo Embrionario 58% (n=31)
			Maduros (presencia de 1° cuerpo polar) 42% (n=22)
No Vitrificado (n=231)	60% (n= 139)	40% (n=92)	Desarrollo Embrionario 46% (n=42)
			Maduros (presencia de 1° cuerpo polar) 54% (n=50)

A continuación, se presenta una tabla que contiene fotografías de la morfología que presentaban los ovocitos maduros de cada uno de los grupos de trabajo, a diferentes tiempos (Tabla 2).

**Tabla 2. Morfología de los ovocitos maduros de ambos grupos de trabajo, a diferentes intervalos de tiempo (Fotografías tomadas con VelabView).**

	<b>Ovocitos maduros no criopreservados</b>	<b>Ovocitos maduros criopreservados</b>
<b>Presencia de primer corpúsculo polar en ambos grupos. (40 x)</b>		
<b>Desarrollo embrionario después de 24 hrs de la FIV. (40 x)</b>		
<b>Desarrollo embrionario después de 48 hrs de la FIV. (40X)</b>		

### Efecto de la criopreservación de ovocitos inmaduros sobre su maduración en cultivo.

Para evaluar el efecto de la vitrificación ultrarrápida en la maduración de los ovocitos, se trabajó con los dos grupos: el que fue vitrificado y el no vitrificado. La maduración de los ovocitos en cultivo se determinó observando la presencia del primer cuerpo polar, que indica que el ovocito ha madurado (Metafase II).

Los resultados mostraron que el porcentaje total de células maduras fue mayor en el grupo no vitrificado que en el criopreservado (54 y 42%, respectivamente (Tabla 1). Sin embargo, al analizar los promedios por experimento, se obtuvo que el grupo vitrificado tuvo ligeramente mejores resultados, con un porcentaje de ovocitos que presentaron el primer cuerpo polar de aproximadamente 41.2%, frente al 39.38% del grupo control (Fig. 5). Es importante destacar que esta diferencia fue muy pequeña y no significativa estadísticamente ( $p > 0.05$ ), lo que indica que la vitrificación ultrarrápida no tuvo un efecto negativo ni positivo claro en la maduración de los ovocitos en este objetivo.

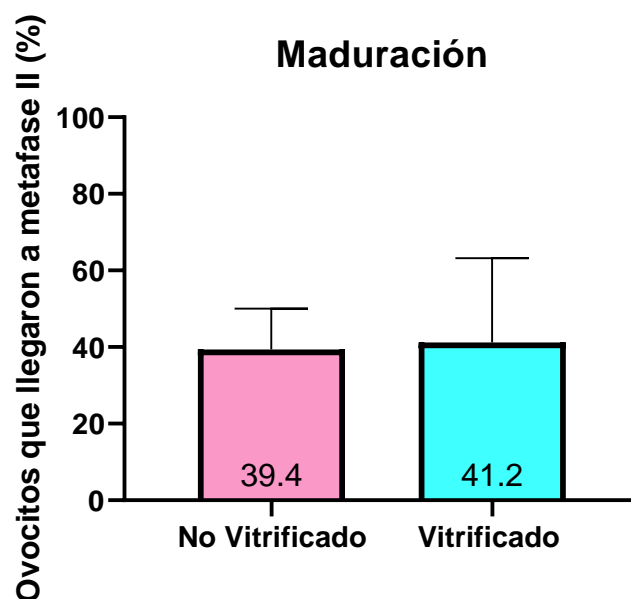


Fig. 5. Porcentaje de los ovocitos del grupo no vitrificado y vitrificado que maduraron en cultivo (alcanzaron metafase II).

#### Efecto de la criopreservación sobre la capacidad de fecundación de los ovocitos

El proceso de vitrificación al que fueron sometidos los ovocitos no afectó su capacidad de fecundación, pues en este grupo se tuvo un porcentaje de células maduras que iniciaron el desarrollo embrionario después de la FIV similar al del grupo no vitrificado (Fig. 6B). En el grupo control el 48.38% de los ovocitos madurados fueron fecundados, en tanto en el grupo experimental se logró la fecundación del 53.16% de las células maduras. En el análisis estadístico se obtuvo que no existe diferencia significativa entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ).

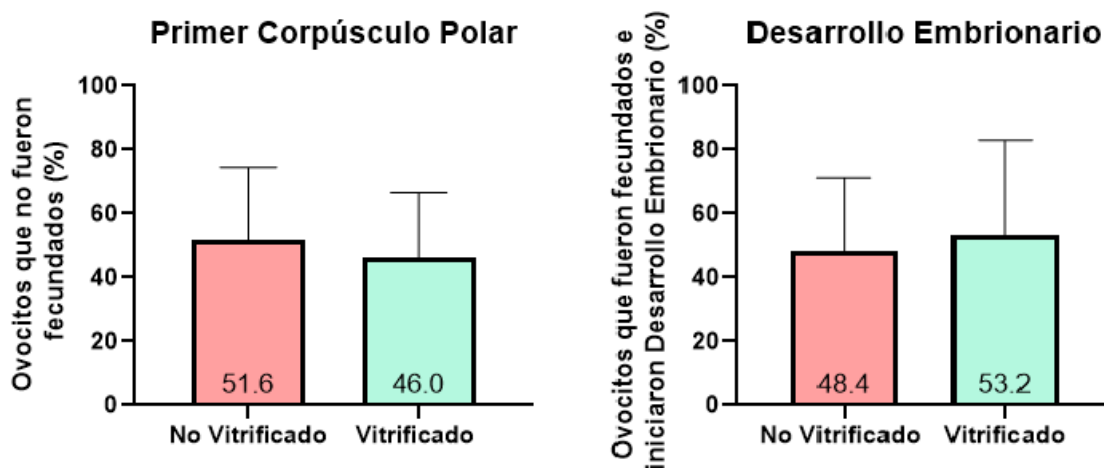


Fig. 6. (A) Porcentajes de ovocitos control y experimental que quedaron arrestados en etapa de metafase II, es decir, que no fueron fecundados en el proceso de FIV. (B) Porcentajes de ovocitos control maduro (sin vitrificación y FIV) y ovocitos experimentales maduros (criopreservados y FIV) que fueron fecundados y presentaron desarrollo embrionario. Nótese que esta proporción es prácticamente la misma entre ambas cohortes.

Así mismo, se registró el porcentaje de ovocitos que solo se quedaron en etapa de maduración y no lograron una fecundación exitosa, representando el 51.61% en el

grupo no vitrificado y el 36.83% en el grupo vitrificado (Fig. 6A). Nuevamente, no hubo una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

El peso registrado para los ratones, previo a su sacrificio, fue adecuado para ambos grupos (machos y hembras) en función de su edad y talla, correspondiendo con base a la literatura de que el peso del ratón macho supera ligeramente al de la hembra (Zúñiga et al., 2015).

En este trabajo se desarrolló la técnica de criopreservación ultrarrápida en crioviales, basándonos en la metodología de Kuwayama y cols., obtuvimos que nuestra modificación a este procedimiento permite una adecuada preservación de la estructura celular de los gametos, lo que puede resultar idónea para las tasas de éxito en la MIV y posteriormente la FIV.

Estudios previos como el de Remohí Giménez et al. (2013) y Torra-Massana & Esbert (2016) han reportado que las TRA como la vitrificación ultrarrápida, la MIV y FIV tienen resultados favorables para las parejas que optan por estas alternativas, por lo que el uso de estas técnicas es factible sin la necesidad de que sea criopreservado el ovocito en metafase II. Su eficacia radica principalmente en la correcta aplicación de agentes crioprotectores y la capacidad de manejar las células con precisión y hacer una identificación adecuada. Aunado a eso, la vitrificación permite congelar los ovocitos u óvulos a edades más tempranas en los mamíferos para utilizarlos en el futuro, lo que es útil para postergar la maternidad o para aquellos animales con problemas de fertilidad.

Desde hace años se tenía el propósito de desarrollar tecnologías para la criopreservación en la etapa más temprana de células germinales masculinas (espermatogonias, espermátidas) y femeninas (folículo primordial), con la maduración posterior in vitro hasta la etapa deseada (Woods et al., 2004), es por

ello que la fecundación y el desarrollo del embrión completamente en condiciones *in vitro* a partir de folículos primordiales se ha logrado en ratones; sin embargo, las técnicas para ésta y otras especies aún sigue en desarrollo (Leonel et al., 2024). Por lo que gracias a diversos trabajos se han publicado más de 400 artículos referentes a las tasas de supervivencia y desarrollo de ovocitos y embriones con vitrificación a lo largo de las últimas décadas (Vajta & Yovich, 2008).

Los resultados obtenidos demuestran que la criopreservación por vitrificación ultrarrápida no afecta la estructura morfológica de los ovocitos ya que el porcentaje de células con una morfología adecuada fue similar al de las células no criopreservadas. Consideramos que este efecto positivo se atribuye al uso de la mezcla de los crioprotectores etilenglicol (permeable) y sacarosa (no permeable), que preservaron la viabilidad de la célula, ya que parte de su mecanismo de acción es promover una rápida deshidratación y amortiguar el efecto de la alta concentración de solutos en el interior de la célula. Es por ello que obtuvimos que, en promedio, el 40% de los ovocitos en ambos grupos desarrollaron su maduración *in vitro* después de haber sido madurados en medio de cultivo HTF.

Si bien históricamente la MIV ha tenido un menor éxito en las tasas de implantación, embarazos clínicos y porcentaje de nacidos que la técnica FIV estándar (Walls et al., 2014), podemos proponer que si se implementaran medios de cultivo por tiempos prolongados podríamos tener un desarrollo embrionario más adecuado gracias a los nutrientes proporcionados por la composición de los diferentes medios que se van utilizando (Remohí Giménez et al., 2013), en concordancia con los cambios en las necesidades metabólicas del embrión en desarrollo. Por ejemplo, Veeck et al. (1983) utilizaron el medio Ham's F10 para el crecimiento de células diploides humanas, logrando que sea igual de eficiente que la FIV.

Por otro lado, se tiene registro de que diversos protocolos de congelamiento y vitrificación de embriones o de ovocitos han sido exitosos en ratones y ganado

(Woods et al., 2004), por lo que el empleo de crioviales resulta ser una alternativa efectiva y rentable, ya que ofrecen la ventaja de almacenar una mayor cantidad de volumen en comparación con los cryotops, de acuerdo con lo reportado por Seki et al. (2023). En este trabajo encontramos que el proceso de criopreservación no afecta la capacidad de los ovocitos para ser fecundados por medio de la técnica *in vitro*, ya que fueron similares los resultados de ambos grupos. También obtuvimos que los ovocitos pueden ser vitrificados en etapa de maduración o inmaduros y mantener una probabilidad mayor al 50% de ser fecundados al ser sometidos a la FIV. Sin embargo, el desarrollo embrionario no superaba el día 2, lo cual puede atribuirse al espacio en donde se desarrollaron los experimentos; de acuerdo con Remohí Giménez et al. (2013), las condiciones a las que los gametos y embriones son expuestos son pieza clave para un desarrollo adecuado, ya que durante un proceso de cultivo o FIV las células se ven sometidas a una serie de situaciones artificiales como los cambios de temperatura, la presión de CO<sub>2</sub> de la cámara de incubación, por ejemplo, que pueden llegar a afectar la viabilidad y desarrollo.

## **Perspectivas**

Por lo tanto, una perspectiva a futuro sería realizar la maduración de los ovocitos en diferentes tipos de medio de cultivo, o bien implementar el cultivo secuencial como se ha probado en otros estudios (Dorado et al., 2006). Por ejemplo, podría estudiarse el efecto de cambiar el medio al segundo día por uno que suplemente el desarrollo del embrión, como el caso del medio G-2™ Plus, que es utilizado como medio de cultivo en embriones humanos para poder potencializar el progreso del embrión desde la etapa de 8 células en el tercer día hasta la etapa de blastocisto (Dorado et al., 2006).

Otros estudios futuros que se deben abordar son la evaluación del uso de nuevos medios de cultivo en ambientes del laboratorio adecuados para aumentar el porcentaje de ovocitos madurados. También se deben realizar estudios donde se renueven los medios de cultivo de los ovocitos fecundados cada 24 horas, para ayudar a mantener su viabilidad y desarrollo. De igual manera, es necesario realizar

estudios con diferentes crioprotectores o bien usar otras concentraciones de los mismos crioprotectores de este trabajo, para analizar si existen mejorías en la preservación de las células.

Es necesario además realizar análisis morfométricos de los ovocitos que fueron vitrificados y no vitrificados, para contar con medidas cuantitativas de su alta calidad para usarlos en un tratamiento como la FIV. Actualmente, se utilizan programas de inteligencia artificial que son capaces de evaluar y ayudar en el análisis de la viabilidad y secuencia de formación ovocitos y embriones, por lo que podría tomarse en cuenta para implementarlo en futuros estudios en esta línea de investigación (Jiang et al., 2023).

Finalmente, es necesario llevar estos estudios y aplicarlos para la preservación de especies mamíferas en peligro de extinción además de dar solución a problemáticas en pacientes femeninas.

## **CONCLUSIÓN**

La criopreservación por vitrificación ultrarrápida no tiene un impacto negativo en los ovocitos inmaduros, ya que éstos son capaces de madurar en medio de cultivo HTF y de ser fecundados en una FIV, logrando el inicio del desarrollo embrionario.

# ANEXOS

## Medios y soluciones

Para el proyecto se requirieron utilizar medios que fueron realizados y comprados de acuerdo con la metodología de cada TRA que se desarrolló.

Tabla 1. Composición de medios y función de medios utilizados en el proyecto.

Medio	Función	Compuesto
HTF+ Albúmina	Capacitación de los espermatozoides.	Albumina 4% (0.2 ml de albumina) Medio HTF (10 ml)
Solución de Equilibrio	Solución de componentes hidrosolubles de baja citotoxicidad que evitan y disminuyen la formación de cristales de hielo al bajar la temperatura.	Etilenglicol 15% (15 gr en 100 $\mu$ L) H <sub>2</sub> O destilada (25 ml).
Solución de Vitrificación	Solución que lleva incorporados crioprotectores de alta concentración.	Etilenglicol 15% (15 gr en 100 $\mu$ L). Sacarosa (4.27 gr).
Sacarosa 0.5 M	Primera solución de sacarosa para el método de desvitrificación.	4.27 g de sacarosa (0.5M) H <sub>2</sub> O destilada (25 ml)
Sacarosa 0.1 M	Segunda solución de sacarosa para el método de Desvitrificación	0.854 g de sacarosa (0.1M) H <sub>2</sub> O destilada (25 ml)
DPBS (InVitroCare)	Solución fisiológica para mantenimiento de fisiología y morfología celular.	Agua ultrapura Cloruro de sodio Cloruro de potasio Dihidrogenofosfato de potasio Dihidrogenofosfato de sodio deshidratado
HTFsa	Medio utilizado como medio de cultivo para el desarrollo de embriones. Solución sintética.	Bicarbonato de Sodio 25mM Sin Albúmina humana fracción V Con/Sin antibiótico
Aceite Mineral	Se emplea para cubrir las placas de cultivo con el propósito de mantener constantes la temperatura, la osmolalidad y pH.	Aceite transparente e incoloro, compuesto principalmente de alcanos y cicloalcanos

## LITERATURA REVISADA

1. Ávila Portillo, L. M., Madero, J., I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., & Gómez, C. (s. f.). Fundamentos de criopreservación. Recuperado en 28 de marzo de 2025 de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74342006000400008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008)
2. Beltrán, C., Trevino, C. L., Mata-Martínez, E., Chávez, J. C., Sánchez-Cárdenas, C., Baker, M., and Darszon, A. (2016). Role of Ion Channels in the Sperm Acrosome Reaction. En Mario G. Buffone (coord. ed.), *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* (pp. 35–69). Switzerland: Springer International Publishing Switzerland
3. Bizarro Nevares, Patricia, Rojas-Lemus, Marcela, González-Villalva, Adriana, López-Valdez, Nelly, Albarrán-Alonso, Juan Carlos, & Fortoul van der Goes, Teresa I. (2018). Estilo de vida, contaminación atmosférica y problemas que afectan la salud reproductiva en la mujer. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 61(2), 7-15. Recuperado en 26 de marzo de 2025, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422018000200007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422018000200007&lng=es&tlng=es).
4. Boiso, I. (2001). Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 4, 1–18.
5. Chian, RC., Wang, Y., y Li YR (2014) Oocyte vitrification: advances, progress and future goals. *J. Assist Reprod Genet* 31:411-420.
6. Comtet, M., Benard, J., y Grynberg, M. (2017). Preservación de la fertilidad femenina, EMC - Ginecología-Obstetricia, Volume 53, Issue 1,2017.
7. Dorado, M., Marqués de Oliveira, N., Lorenzo, C., Vázquez, G. & Marco, Y. (2006). Evolución de los medios de cultivo embrionario en técnicas de reproducción asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 23, 31-36.
8. \_European Society of Human Reproduction and Embryology. (2016).B.Oocyte maturation stage. *Atlas of Human Embryology* Recuperado en 28 de marzo de 2025, de <https://atlas.eshre.eu/es/1454662357452400>

9. *Especies en categoría de riesgo*. (s. f.). PROFEPA. Recuperado en 10 de enero de 2025, de [https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6580/1/mx.wap/especies\\_en\\_categoria\\_de\\_riesgo.html](https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6580/1/mx.wap/especies_en_categoria_de_riesgo.html)
10. Feng, R., & Chen, B. (2024). Environmental risks and infertility in China. *Science*, 383(6680), 267-268. Recuperado el 28 de Abril de 2025 de, <https://doi.org/10.1126/science.adn3214>
11. García Amador, M., Chávez Badiola, A., Medina Flores, J., Montoya Sarmiento, J., Quiroz Torres, E., Martínez Armas, R., & Ruvalcaba Castellón, L. (2009). Vitrificación en cryotop: un método altamente eficaz para la criopreservación de ovocitos humanos. *Gaceta Mexicana de Oncología*.
12. Gilbert, S. F. (2005). *Biología del desarrollo*. Editorial Médica Panamericana S.A.
13. Hall, J. E., Guyton, A. C., & Hall, M. E. (2021). *Tratado de fisiología médica (14ª)*. Elsevier.
14. Hildebrandt, T. B., Hermes, R., Colleoni, S., Diecke, S., Holtze, S., Renfree, M. B., Stejskal, J., Hayashi, K., Drukker, M., Loi, P., Göritz, F., Lazzari, G., & Galli, C. (2018). Embryos and embryonic stem cells from the white rhinoceros. *Nature Communications*, 9(1). Recuperado en 28 de abril de 2025, de <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04959-2>
15. Hildebrandt, T. B., Holtze, S., Colleoni, S., Hermes, R., Stejskal, J., Lekolool, I., Ndeereh, D., Omondi, P., Kariuki, L., Mijele, D., Mutisya, S., Ngulu, S., Diecke, S., Hayashi, K., Lazzari, G., De Mori, B., Biasetti, P., Quaggio, A., Galli, C., & Goeritz, F. (2023a). In vitro fertilization program in white rhinoceros. *Reproduction*, 166(6), 383-399. <https://doi.org/10.1530/rep-23-0087>
16. Coticchio, I., Dal Canto, M., Mignini Renzini, M., Guglielmo, M. C., Brambillasca, F., Turchi, D., Novara, P. V., & Fadini, R. (2015). Maduración de ovocitos: interacciones gameto-células somáticas, reanudación meiótica, dinámica del citoesqueleto y reorganización citoplasmática. *Actualización de la reproducción humana*, 21(4).

17. Izquierdo, A. C., Mendoza, M. M., Balmaceda, R. A., Torres, J. E. S., Palacios, N. M., Flores, F. V., & Palacios, N. N. M. (2014). Ciencia en producción animal: Reproducción de la hembra.
18. Jiang, V. S., Bormann C. L., (2023). Artificial intelligence in the in vitro fertilization laboratory: A review of advancements over the last decade. *Fertility and Sterility*, 120(1), 17–23. Recuperado en 28 de Abril de 2025, de <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.05.004nn>
19. Khalili, M. A., Shahedi, A., Ashourzadeh, S., Nottola, S. A., Macchiarelli, G., & Palmerini, M. G. (2017). Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, 34(11), 1413-1426. Recuperado el 10 de Enero de 2025 de <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1005-4>
20. Kuwayama, M., & Leibo, S. (2010). Crioconservación de embriones y ovocitos humanos. *Journal of Mammalian Ova Research*, 27(3), 79-86. <https://doi.org/10.1274/jmor.27.79> Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., & Leibo, S. P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 11(3), 300-308.
21. Larregle, M., & Young, P. (2021). Fertilización in vitro: un recorrido por la historia. *1 Fronteras en Medicina*, 16(2), 137-144. Recuperado el 28 de abril del 2025 en <https://doi.org/10.31954/RFEM/202102/0137-0144>
22. Leonel, E. C. R., de Miranda Vasconcellos, V. J., & Amorim, C. A. (2024). Modelos animales para la criopreservación de ovocitos, embriones y tejido ovárico humano. En Z. P. Nagy, A. C. Varghese, & A. Agarwal (Eds.), *Criopreservación en reproducción asistida*. Springer.
23. Liebermann, J., Tucker, M. J., Graham, J. R., Han, T., Davis, A., & Levy, M. J. (2002). Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reproductive BioMedicine Online*, 4(2), 146-150. Recuperado el 28 de Abril de 2025 de [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61932-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61932-3)

24. Mata-Miranda, M. M., & Vázquez-Zapién, G. J. (2018). La fecundación in vitro: Louise Brown, a cuatro décadas de su nacimiento. *Revista de sanidad militar*, 72(5-6), 363-365. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-696X2018000400363&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-696X2018000400363&lng=es&tlng=es)
25. Mcmillan, H.J. & Wynne-Edwards, K.E. (1998). Evolutionary change in the endocrinology of behavioral receptivity: Divergent roles for progesterone and prolactin within the genus *phodopus*. *Biology of Reproduction*. 59:30-38.
26. Morales Ledesma., (2015). Regulación neuroendocrina del ovario. En *Procesos fisiológicos y toxicológicos de la reproducción* (Primera Edición). Dirección de Fomento Editorial.
27. Palma GA. (2008). *Biotecnología de la Reproducción*. 2ª Edición. Córdoba, Argentina. Talleres Pugliese Siena.
28. Quintana, R., & Young, E. (2014). *Foliculogénesis*. Recuperado el 28 de Enero de 2025 de <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/131442>
29. Rojas, Q., Práxedes, M.T., y Dulce, TA. (2011). Infertilidad. *MediSur*. 9(4), 340-350.
30. Remohí Giménez, J. A., Cobo Cabal, A. C., Prados Dodd, N., Romero Carboller, J. L., & Pellicer Martínez, A. (2013). *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: Laboratorio de reproducción asistida* (4.ª ed.).
31. Seki, S., Kawabe, T., Yamazaki, W., Matsumura, K., Oikawa, T., Obata, T., Higashiya, M., Yano, M., & Eto, T. (2023). Cryopreservation of rat embryos at all developmental stages by small-volume vitrification procedure and rapid warming in cryotubes. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47394-0>
32. Silver LM (ed). *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. Oxford University Press, Oxford, 1995. Recuperado el 28 de Abril en : <http://www.informatics.jax.org/silver/>
33. Singh, R., Kaur, S., Yadav, S., & Bhatia, S. (2023). Gonadotropinas como agentes farmacológicos en la tecnología de reproducción asistida y el síndrome de ovario poliquístico. *Trends in Endocrinology &*

- Metabolism*. Recuperado en 28 de abril de 2025, de <https://doi.org/10.1016/j.tem.2023.02.002>
34. Sirait, B., Jusuf, A. A., Wiweco, B., Handayani, N., Aubry, D. A., & Muharam, R. (2022). Potential Use of Immature Oocyte to Improve Fertility Preservation Outcome. *Journal Of Human Reproductive Sciences*, 15(1). Recuperado en 28 de abril de 2025, de <https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs.112.21>
35. Swanson, W.J. y Vacquier, V.D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genetics*, 3, 137-144. Takeo, T., Nakao, S., Mikoda, N., Yamaga, K., Maeda, R., Tsuchiyama, S., Nakatsukasa, E., & Nakagata, N. (2022). Optimized protocols for sperm cryopreservation and in vitro fertilization in the rat. *Lab Animal*, 51(10), 256-274. Recuperado en 28 de abril de 2025, de <https://doi.org/10.1038/s41684-022-01053-5>
36. Trujillo, A., Gutiérrez, G., Linares, R. Cortes, M.C. y Eguibar, J., (2015). Eje-Hipotálamo-Hipófisis-ovarios. Un viejo conocido, nuevos hallazgos y más por conocer. En *Procesos fisiológicos y toxicológicos de la reproducción* (Primera Edición). Dirección de Fomento Editorial.
37. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2010*. (s. f.). NobelPrize.org. Recuperado en 10 de enero de 2025, de <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2010/speedrea>
38. Torra-Massana, M., & Esbert, M. (2016). Cáncer, esterilidad y técnicas de reproducción asistida. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*.
39. Vacquier, V.D. y Swanson, W.J. (2011). Selection in the rapid evolution of gamete recognition proteins in marine invertebrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, 3(11).
40. Vajta, G., & Yovich, J. (2008). Principios fundamentales de Criobiología. Introducción a la congelación lenta y vitrificación. *Cuadernos de Medicina Reproductiva.*, Volumen 14(3), 9-22.
41. Veeck, L. L., Wortham Jr, J. E., Witmyer, J., Sandow, B. A., Acosta, A. A., García, J. E., & Jones Jr, H. W. (1983). Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 39(5), 594-602.

42. Walls, M. L., Hunter, T., Ryan, J. P., Keelan, J. A., Nathan, E., & Hart, R. J. (2015). In vitro maturation as an alternative to standard in vitro fertilization for patients diagnosed with polycystic ovaries: A comparative analysis of fresh, frozen and cumulative cycle outcomes. *Human Reproduction*, 30(1), 88–96. Recuperado el 28 de abril de 2025, de <https://doi.org/10.1093/humrep/deu248>
43. World Health Organization: WHO. (2019, 10 diciembre). *Infertilidad*. Recuperado el 10 de enero de 2025, de [https://www.who.int/es/health-topics/infertility#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/infertility#tab=tab_1)
44. Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., & Critser, J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48(2), 146-156. Recuperado en 10 de enero de 2025, de <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002>
45. Zúñiga JM., Orellana M. y Tur Marí J. (2015). *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio* Universidad de Alcalá de Henares - SECAL España.