



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CRIOPRESERVACIÓN DE FOLÍCULOS DE OVARIO DE  
HEMBRAS ADULTAS DE LA CEPA CD-1 EN DIFERENTES  
CRIOPROTECTORES

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Presenta

ALEJANDRA GUEVARA TLACUILO

Directora de tesis

DRA. ROSALINA MARIA DE LOURDES REYES LUNA

Septiembre 2021



# AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi total gratitud a las personas que me brindaron su apoyo y confianza para la realización de este trabajo:

En primer lugar, a mi directora de tesis, la Dra. Rosalina Reyes Luna por permitirme ser parte de su equipo en el laboratorio de Biología de la Reproducción, por su confianza, la paciencia, y la constante enseñanza desde el inicio al término de este trabajo.

A la bióloga Zaira Zambrano Caselin, por el constante apoyo en la realización de los experimentos, por su atención y motivación continua.

Al Bioterio Claude Bernard por proporcionarme los ejemplares para la realización de este trabajo.

A Rocio Guadalupe Meléndez Ramos, Viviana Sánchez Galindo y Virginia Leal Cristóbal por todo su apoyo y amistad a lo largo de esta aventura.

A mi familia por su motivación, paciencia, y por el amor que siempre me han brindado.

## **DEDICATORIA**

Con todo el cariño y amor dedico este trabajo a, mis padres: Margarita y Biliulfo; a mi hermana Bianey y a mi hermano Javier, ya que sin su apoyo y sacrificio no hubiera sido posible lograrlo.

A ti Madre, mi principal motor e inspiración, sin ti y tu sacrificio no hubiera llegado hasta aquí, gracias por todo, por tu paciencia, amor, comprensión, por ser mi gran apoyo cuando las cosas no iban bien, por tu confianza y, gracias por siempre alentarme a seguir luchando por mis metas, este logro es tan tuyo como mío.

A ti padre, por tu apoyo incondicional, por tus enseñanzas continuas y por tu paciencia.

A ti hermanita, mi persona, la que siempre me brinda todo su amor y apoyo, gracias por tu complicidad, por ser mi soporte y guía, por siempre estar ahí cuando te necesito.

A ti hermano, gracias por tu apoyo y consejos, y por siempre alentarme a seguir adelante.

**¡GRACIAS INFINITAS!**

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. RESÚMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
2.1. EL OVARIO .....	3
2.2. DESARROLLO FOLICULAR .....	5
2.3. FERTILIZACIÓN.....	11
2.4. INFERTILIDAD .....	12
2.5. CRIOPRESERVACIÓN .....	14
2.6. VITRIFICACIÓN.....	16
2.7. VITRIFICACIÓN DE FOLÍCULOS.....	16
2.8. AGENTES CRIOPROTECTORES.....	17
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	<b>18</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>23</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
7.1. OBJETIVO GENERAL.....	25
7.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
8.1. DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL .....	26
8.2. DETERMINACIÓN DE CICLO ESTRAL.....	27
8.3. OBTENCIÓN DE FOLÍCULOS .....	28
8.4. CRIOPRESERVACIÓN.....	29
8.5. VITRIFICACIÓN RÁPIDA.....	30
8.6. VITRIFICACIÓN ULTRARÁPIDA.....	31
8.7. DESVITRIFICACIÓN .....	31
8.8. VIABILIDAD .....	32
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
9.1. RECUPERACIÓN DE LOS FOLÍCULOS DESPUÉS DE SU DESVITRIFICACIÓN .....	33
9.2. MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD DE FOLÍCULOS DESVITRIFICADOS.....	34
<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>11. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>12. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>44</b>
<b>13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>46</b>

## RESÚMEN

La criopreservación ha demostrado ser una técnica con altos porcentajes de éxito en ovocitos, espermatozoides y embriones en humanos y en otras especies de mamíferos, sin embargo los avances para perfeccionar esta técnica aun continúan. En años recientes se ha observado y comprobado el potencial que tiene la criopreservación de folículos de ovario en diferentes especies de mamíferos, esto con el fin de conservar especies en peligro de extinción y brindar una solución a los problemas de infertilidad en mujeres, o por que simplemente desean posponer su maternidad por diversas causas.

En la criopreservación las células o tejido se conservan a bajas temperaturas (-196°C) a diferentes tasas de enfriamiento, por lo que es un procedimiento complejo, donde se debe realizar un protocolo específico de acuerdo al tipo de células o tejido a conservar, en el caso de tejido ovárico se ha realizado congelación y vitrificación, las cuales han tenido buenos resultados, sin embargo al ser tejido, es más susceptible a sufrir daños en los diferentes tipos de células que lo conforman y no ser viable para su posterior cultivo, en comparación con la criopreservación de folículos aislados, a los cuales el crioprotector penetra al folículo y tiene menos riesgo de sufrir daño y también por que el cultivo in-vitro posterior a la criopreservación es más fácil de llevar a cabo por ser una unidad aislada.

El uso de la congelación también podría aumentar el daño debido a que el descenso de la temperatura en nitrógeno líquido es de forma gradual en comparación con la vitrificación, por lo que es más propenso a la formación de cristales en el interior de la célula, provocando daño en su viabilidad y morfología, y aunque en la vitrificación también hay riesgos con la utilización de diferentes crioprotectores a diferentes concentraciones, es más rápida de realizar y hay menos riesgo de formación de cristales por el uso de los agentes crioprotectores (ACP) a concentraciones adecuadas, los más utilizados y que han demostrado preservar los folículos en diferentes estadios sin ocasionar daños en la viabilidad y morfología en los folículos son etilenglicol y dimetilsulfóxido.

Es por ello que el objetivo del presente trabajo, fue evaluar la criopreservación a través de la vitrificación rápida y ultrarápida de folículos de ovario de hembras adultas de la cepa CD-1 en dos diferentes estadios (preantrales y antrales), con dos diferentes crioprotectores (Dimetilsulfóxido 1.5 M + sacarosa 0.25 M, en medio CZB y Etilenglicol 30% + sacarosa 0.25 M, en medio CZB, para ello después de someter a los folículos a ambas técnicas de vitrificación se realizó tinción con eosina nigrosina y así poder determinar si había daño en viabilidad y la morfología de los folículos.

Se determinó que los folículos antrales se preservaron viables en mayor porcentaje (94%) utilizando vitrificación rápida, también se concluyó que, el crioprotector conformado por DMSO 1.5 M + Sacarosa 0.25 M es el que preserva mejor la morfología y viabilidad de los folículos, tanto preantrales y antrales. No obstante, es necesario ampliar nuestro estudio, realizando

un cultivo de los ovocitos obtenidos de los folículos para madurarlos, y posteriormente realizar una fertilización in-vitro y así recabar resultados más completos acerca de estas técnicas y en un futuro cercano aplicarlos en humanos.

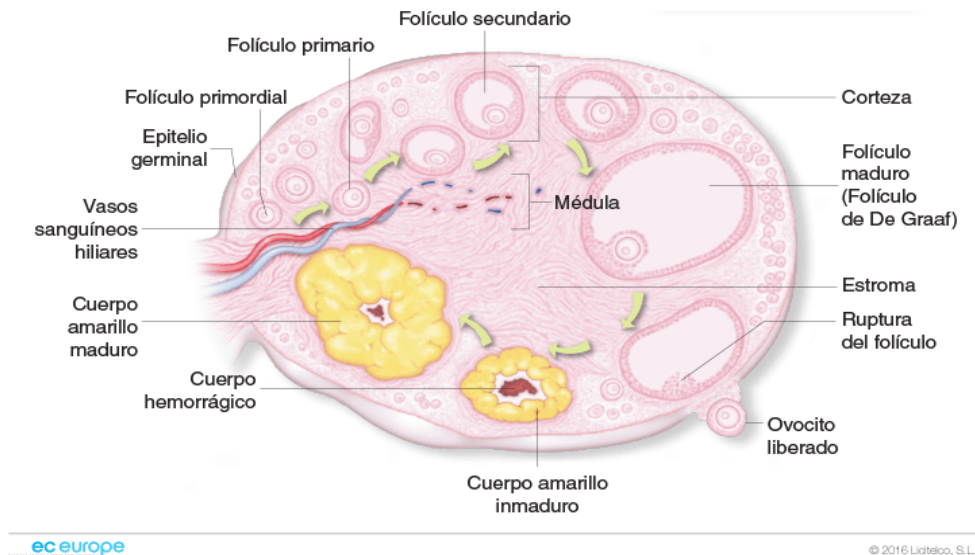
## **INTRODUCCIÓN**

### **EL OVARIO**

Diversas formas de vida son capaces de reproducirse de una generación a la siguiente en condiciones adecuadas. Algunas especies se reproducen solo una vez durante su ciclo de vida, mientras que otras, como los mamíferos, tienen ciclos reproductivos regulados hormonalmente; estos ciclos ováricos (estrales) son muy importantes ya que en ellos se basa la reproducción, están dados por el tiempo que transcurre entre una y otra ovulación (salida de uno o más óvulos simultáneamente del ovario). Este período de tiempo es muy variable entre las especies, existiendo ciclos de horas hasta ciclos de varios días.

En las hembras, la edad de la primera ovulación es variable según la especie y recibe el nombre de pubertad. Además hay muchos factores genéticos y ambientales que la afectan (nutrición, temperatura, sanidad).

El ovario es fundamental para el proceso de reproducción, ya que es el encargado de la secreción de hormonas, desarrollo folicular, maduración y liberación de los ovocitos para su posible fertilización. Anatómicamente, el ovario consiste en tres regiones: una corteza externa que contiene al epitelio germinal que origina a los folículos, una médula central constituida por un estroma de tejido conectivo laxo y fibroso, y un hilum, que se encuentra alrededor de la zona de unión del ovario al mesovario, a través del cual se insertan en la gónada las fibras nerviosas y los vasos sanguíneos. **(Fig. 1)**



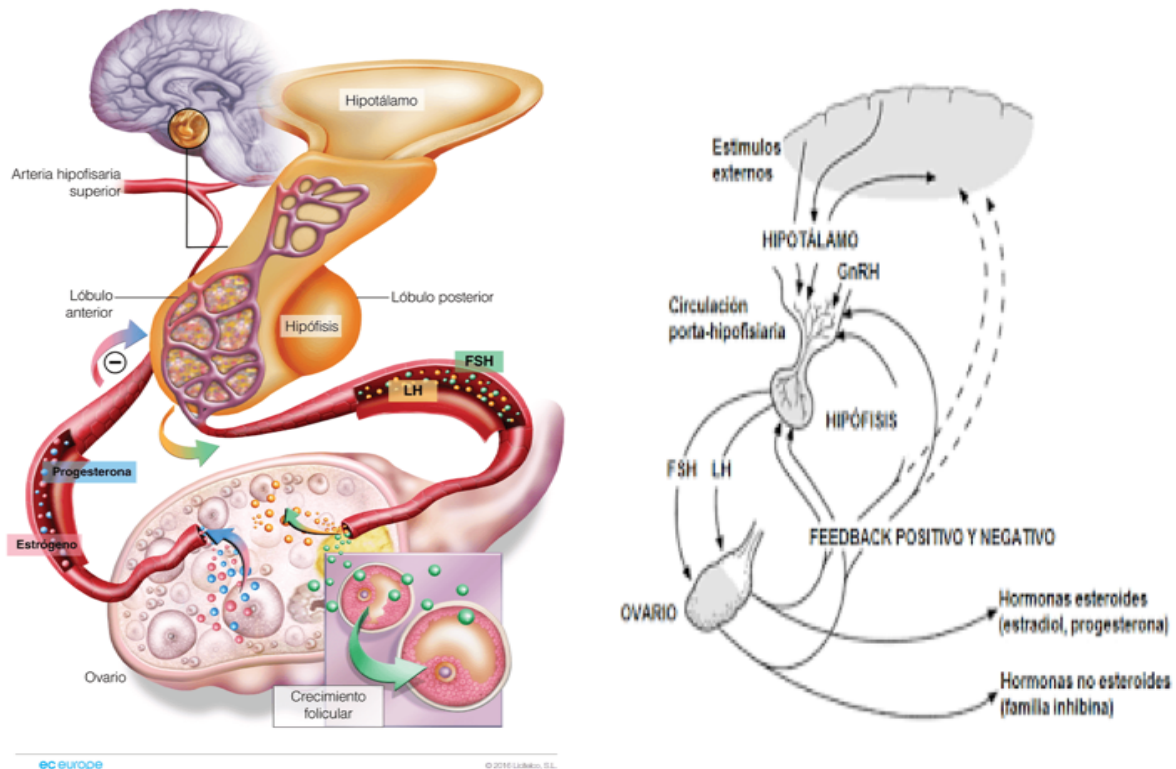
**Figura 1.** Estructura interna del ovario de mamífero, que muestra las 3 regiones, la corteza que es la región más externa del ovario y en donde se localizan los folículos, la médula, la cual es la región más interna, constituida por tejido laxo muy vascularizado e innervado y el hilio que contiene vasos sanguíneos y linfáticos, se visualizan células productoras de andrógenos con las características de las células que sintetizan hormonas esteroideas. También se observan las fases del desarrollo folicular, comenzando con el folículo primordial, hasta la ruptura del folículo y el ovocito liberado, posteriormente la formación del cuerpo lúteo. Recuperado de [https://www.ec-europe.com/wp-content/uploads/2016/06/8\\_Anatom%C3%ADa-del-ovario.png](https://www.ec-europe.com/wp-content/uploads/2016/06/8_Anatom%C3%ADa-del-ovario.png)

El ovario es una glándula con funciones gametogénicas y endocrinas, que se encuentran reguladas a través del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

El eje hipotalámico-hipófisis-ovario es el principal responsable de regular la actividad reproductiva y la liberación de hormonas ováricas en animales y humanos (Couse *et al.*, 2003; Vadakkadath y Atwood, 2005).

Este eje coordina un circuito de retroalimentación regulado por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) producida por el hipotálamo; la hormona foliculoestimulante

(FSH) y hormona luteinizante (LH) de la adenohipófisis y los esteroides sexuales, estrógeno, progesterona y andrógenos, producidos principalmente por el ovario, el cuerpo lúteo y las glándulas suprarrenales (Gordon-Elliot *et al.*, 2017). **(Fig. 2)**



**Figura 2.** Ilustraciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hipotálamo es el encargado de producir de manera pulsátil GnRH y a través del sistema porta viajan hacia el lóbulo anterior de la hipófisis, posteriormente esta, libera dos hormonas glicoproteicas, que son FSH y LH, las cuales actúan directamente en el ovario para que este pueda llevar a cabo el desarrollo folicular, la liberación periódica del ovocito y la formación del cuerpo lúteo, el ovario regula estas hormonas liberando hormonas esteroideas (estrógenos) y no esteroideas (inhibina). Recuperado de [https://www.ec-europe.com/wp-content/uploads/2016/06/2\\_Eje-hipotálamo-hipofisario-ovario.png](https://www.ec-europe.com/wp-content/uploads/2016/06/2_Eje-hipotálamo-hipofisario-ovario.png)

## DESARROLLO FOLICULAR

Después de la secreción cíclica de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) se liberan de manera periódica ovocitos los cuales están contenidos

en los folículos, estos, son la unidad básica del ovario en los mamíferos. El folículo es una estructura de tejido compleja que nutre el crecimiento del ovocito y también sirve como el órgano endocrino que suministra las hormonas femeninas estrógeno y progesterona (Hawkins y Matzuk, 2008). Un folículo ovárico consiste en un ovocito que está rodeado por células somáticas, las cuales están encerradas por una membrana basal (lámina basal), el tamaño del folículo cambia drásticamente a medida que avanza el desarrollo del folículo, el tamaño final del folículo preovulatorio es proporcional al tamaño del animal y, por lo tanto, es muy variable. En ratones, el diámetro de un folículo preovulatorio es ~ 400  $\mu\text{m}$ , en humanos ~ 2 cm, y en un animal grande como un rinoceronte, es ~ 12 cm (Bächler *et al.*, 2013). El número de células somáticas que rodean al ovocito también cambia drásticamente según la etapa de desarrollo del folículo, de ~5 células en un folículo primordial a ~1000 células en folículos preovulatorios en ratones (Griffin *et al.*, 2006).

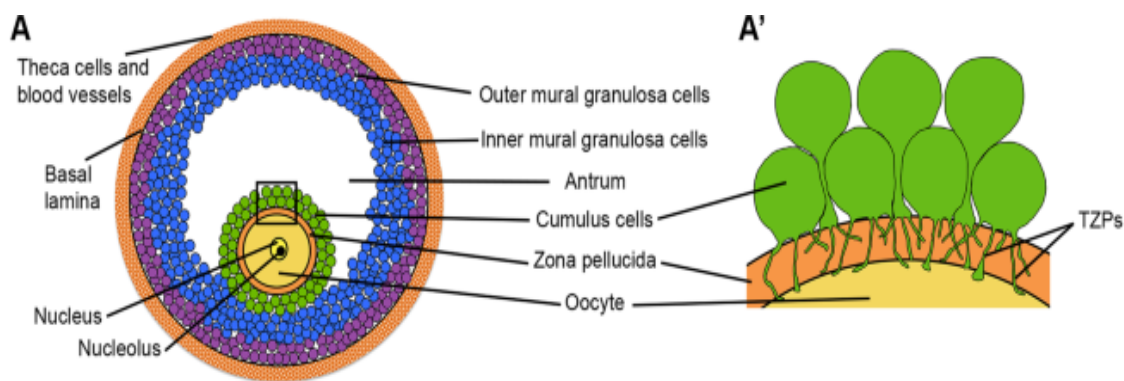
El desarrollo del folículo comienza con un pequeño ovocito rodeado por una sola capa de células somáticas delgadas ("folículo primordial") y crece hasta alcanzar su tamaño completo en el transcurso de 3 a 4 ciclos estrales (Hirshfield, 1991) (cada ciclo es de ~ 4 días). El desarrollo del folículo implica múltiples interacciones paracrinias, por ejemplo, el factor de diferenciación de crecimiento-9 (GDF9) es sintetizado por el ovocito y es necesario para que el folículo se desarrolle más allá de la etapa de una sola capa (Dong, *et al.*, 1996 ).

Cuando el folículo se encuentra en la etapa antral, una lámina basal encierra alrededor de 1000 células de la granulosa, que forman múltiples capas alrededor del ovocito. Las 2-3 capas de células adyacentes al ovocito se conocen como células de cúmulo (o células de la granulosa), mientras que las células de las capas externas del folículo se conocen como células de la granulosa mural.

La forma en que las señales se transmiten a través de estas ~ 10 capas de células desde el exterior del folículo hasta el ovocito sigue siendo un interés de investigación activo en biología reproductiva. Una de las formas en que las señales se transmiten en

el folículo es a través de uniones gap, estas uniones gap están compuestas principalmente de conexina-43 que son las que conectan a todas las células de la granulosa entre sí (Mayerhoferand y Garfield, 1995), y otras uniones gap compuestas principalmente de conexina-37 (posiblemente en combinación con conexina-43) conectan las células del cúmulo con el ovocito (Simon *et al.*, 2006). Estas uniones son cruciales para transmitir mensajeros secundarios, metabolitos, iones y otras moléculas de tamaño inferior a 1 kDa al citoplasma del ovocito.(Bruzzzone *et al.*, 1996).

En las uniones gap que se localizan entre las células del cúmulo y el ovocito se encuentran presentes unas estructuras notables llamadas proyecciones transzonales (Li y Albertini, 2013; Clark, 2018) (TZP). Se trata de proyecciones citoplasmáticas delgadas que se originan en las células del cúmulo y atraviesan de 3 a 5 micras del espesor de la matriz extracelular del ovocito (zona pelúcida). Se ponen en contacto con la superficie del ovocito en las uniones adherentes (Mora, 2012) y las uniones gap. Debido a que las TZP proporcionan el sitio de comunicación de unión gap y posiblemente de otras interacciones entre el ovocito y las células del cúmulo, son elementos estructurales cruciales del folículo. Sin embargo, debido a su densidad y complejidad, la organización tridimensional de los componentes de los ovocitos, TZP, y sus uniones es poco conocida. **(Fig. 3)**



**Figura 3.** Diagrama de folículo antral en el que se observa la ubicación de las proyecciones trazonales (TZPs) las cuales se originan en las células del cúmulo atravesando la zona pelúcida para tener comunicación directamente con el ovocito. Baena V. y Terasaki M. (2019). Three-dimensional organization of transzonal projections

*and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle. [Figura 1]. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/s41598-018-37766-2/figures/1>*

De acuerdo a su organización estructural, pueden definirse cinco fases del desarrollo folicular: folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios y de Graff o preovulatorios, también es común clasificar los folículos en preantrales (desde primordiales hasta secundarios) y antrales (desde terciarios hasta preovulatorios). Una vez llevada a cabo la ovulación, la estructura folicular evoluciona hacia la formación de un cuerpo lúteo, considerado como la fase final de maduración del folículo. **(Fig. 4)**

### ***Folículo primordial***

El folículo primordial está compuesto por un ovocito, arrestado en el estadio de diploteno de la profase meiótica, rodeado por una capa de células planas epiteliales llamadas células de la granulosa. Carece de células de la teca y tejido conectivo. Los folículos primordiales representan un reservorio de folículos en estado de reposo que disminuyen a lo largo de la vida reproductiva. La iniciación del crecimiento folicular es un proceso continuo e independiente de la acción de gonadotrofinas (Peters *et al.*, 1973).

### ***Folículo primario***

La transformación de folículo primordial en folículo primario, ocurre durante la vida fetal; el ovocito aumenta de tamaño y la capa de células foliculares cambia su morfología de plana a cúbica en roedores (Richards, 1980). En humanos, desde el quinto mes de vida fetal hasta la menopausia, la maduración folicular es continua. Entre el ovocito y las células foliculares, se desarrolla un espacio en el cual penetran microvellosidades del oolema y de las células foliculares vecinas; se acumula en ese espacio un material amorfo sintetizado por el ovocito y células foliculares llamado zona pelúcida. La zona

pelúcida es una capa glicoproteica que envuelve las microvellosidades del ovocito y de las células foliculares (Parborell, 2002).

### ***Folículo secundario***

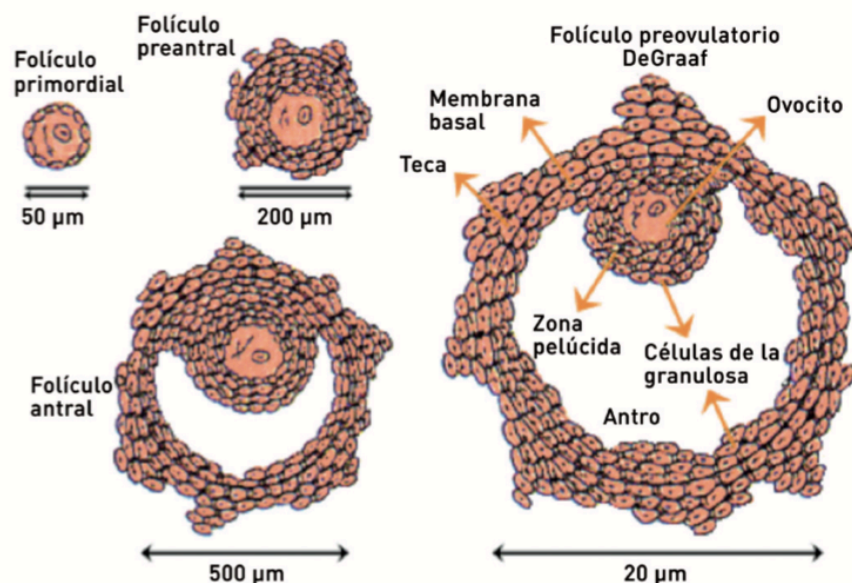
La transformación del folículo primario a secundario, implica la transformación de células foliculares que forman un epitelio estratificado alrededor del ovocito, llamándose células de granulosa. (Bloom *et al*, 1986).

### ***Folículo terciario***

En el folículo terciario (antral), las células de la teca se dividen en dos capas: una interior, glandular y vascularizada, llamada teca interna; y otra exterior, formada por tejido conectivo y células del músculo liso, denominada teca externa. (Parborell, 2002) .

### ***Folículo de Graaf o preovulatorio***

Son folículos antrales, de gran tamaño en comparación a los otros tipos de folículos, que tienen varias capas de células de la granulosa. Las prolongaciones citoplasmáticas de las células granulosas continúan penetrando en la zona pelúcida y proporcionan nutrientes y señales hormonales a los ovocitos primarios en maduración. Este paso es dependiente de FSH que, además de inducir la proliferación de las células de la granulosa, incrementa el número de receptores de éstas, potenciando su propio efecto. Además, parece ser que la LH dirige la diferenciación de las células tecales que rodean al folículo. El ovocito ahora se desplaza hacia una posición excéntrica y se rodea de una capa llamada cumulus oophorus (de 2 ó 3 células de grosor). Al final de esta fase el complejo, folículo preovulatorio o de Graaf, alcanza un diámetro medio de 2 a 5mm. Son estos folículos los que llegan a la etapa de la ovulación. (McGee y Hsueh, 2000)



**Figura 4.** Esquema representativo de los diferentes estadios foliculares, comenzando con el folículo primordial el cual solo contiene un ovocito rodeado de una sola capa de células pregranulosas aplanadas y cuboides, el folículo preantral (secundario) contiene al menos dos capas completas de células de la granulosa, el folículo antral contiene múltiples capas de células de la granulosa y una pequeña cavidad antral, por ultimo el folículo preovulatorio o DeGraaf la cavidad antral ocupa la mayor parte del volumen folicular total.

Haya J. (2015) PERIMENOPAUSIA.[Figura 4]. Recuperado de [http://www.institutotomaspascualsanz.com/wp-content/uploads/2015/02/VIVESOY\\_PREMENOPAUSIA.pdf](http://www.institutotomaspascualsanz.com/wp-content/uploads/2015/02/VIVESOY_PREMENOPAUSIA.pdf)

Normalmente el desarrollo folicular en el ovario se mantiene detenido en la fase de folículos primordiales hasta que se inicia la pubertad. De aquí en adelante, y dependiendo de la especie estudiada, uno o más folículos considerados dominantes lograrán terminar su desarrollo y sus ovocitos se liberarán a un tiempo determinado dentro del ciclo estral. Los folículos que no llegan a terminar su desarrollo se degenerarán, convirtiéndose en atresicos (Van Voorhis, 1999).

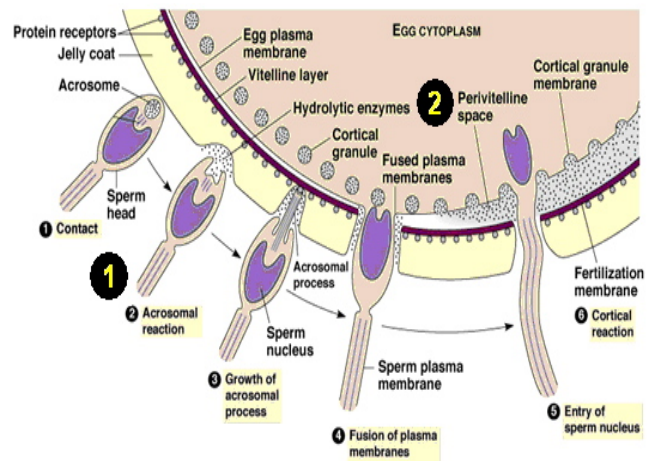
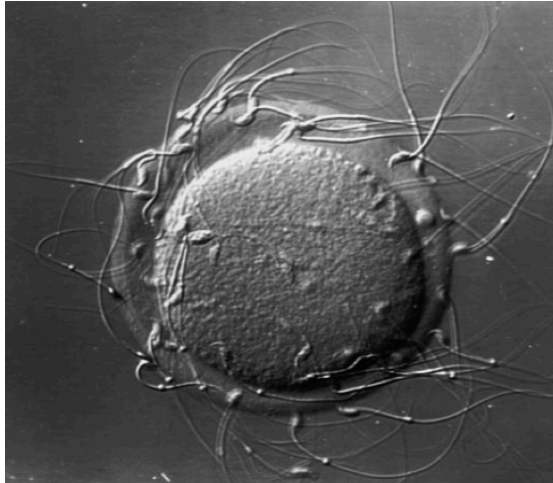
## FERTILIZACIÓN

La fertilización es uno de los procesos biológicos descritos más fascinantes y a la vez complejo. La interacción entre células altamente especializadas proporciona un ejemplo único de muchos procesos celulares (adhesión celular específica, señales celulares, regulación de exocitosis, migración celular, fusión celular y regulación del ciclo celular) y convierte dos células totalmente diferenciadas en un cigoto totipotente capaz de formar todos los tipos celulares existentes en el organismo (Miller, 2002).

En los mamíferos la fertilización ocurre cuando los gametos (óvulos en la hembra y espermatozoides en el macho) se unen y posteriormente se origina un individuo completo con las características propias de la especie. Los órganos donde se producen estas células se denominan gónadas; en los mamíferos las gónadas masculinas son los testículos y las femeninas los ovarios. Hay otras estructuras que intervienen en la reproducción: en las hembras los oviductos (canales que comunican el ovario con el útero), el útero (cavidad donde se desarrolla el embrión) y la vagina (canal de recepción del órgano copulador masculino); en los machos, el órgano copulador o pene que en comunicación con los testículos, se encargará de depositar los espermatozoides en la vagina de la hembra.

La fertilización en los mamíferos comprende al menos cinco pasos que tienen lugar en un orden obligatorio. Existe alguna evidencia que indica que los espermatozoides de mamíferos pueden ser atraídos al óvulo por un quimio atrayente (por ejemplo, péptidos termoestables) emitido por las células del folículo que rodean el óvulo. (Paso 1) los espermatozoides con un acrosoma intacto deben primero unirse de una manera específica de la especie a la capa acelular gruesa, o zona pelúcida (ZP), del óvulo. Una vez unidos a la ZP, los espermatozoides deben experimentar la reacción acrosómica o exocitosis celular (Paso 2) y luego penetrar en la ZP (Paso 3). Al alcanzar el espacio perivitelino que se encuentra entre la ZP y la membrana plasmática, los

espermatozoides deben unirse a la membrana plasmática (Paso 4) y luego fusionarse con ella (Paso 5), (Wassarman, 2001). (Fig. 5)



**Figura 5.** La imagen de la izquierda es una fotografía de microscopía Nomarski (DIC) de un espermatozoide de ratón unido a la ZP de un ovocito tratando de fertilizarlo. La imagen de la derecha representa el proceso de fertilización considerando el contacto que establece el espermatozoide con el ovocito hasta la fusión de la membrana plasmática de ambos para lograr la fertilización.

Cabej N. (2013). *Building the Most Complex Structure on Earth* (pp.121 - 192). [Figura 3.1]. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/284724217\\_Ch\\_3\\_-\\_Epigenetic\\_Control\\_of\\_Animal\\_Development\\_BUILDING\\_THE\\_MOST\\_COMPLEX\\_STRUCTURE\\_ON\\_EARTH\\_2013](https://www.researchgate.net/publication/284724217_Ch_3_-_Epigenetic_Control_of_Animal_Development_BUILDING_THE_MOST_COMPLEX_STRUCTURE_ON_EARTH_2013)

## INFERTILIDAD

Se define como infertilidad en el humano a la falta de embarazo luego de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección anticonceptiva. Aunque en muchos casos no es posible evidenciar algún tipo de enfermedad o patología que la cause, han llegado a considerarse un problema frecuente a investigar por los profesionales de la salud (Rojas, 2011).

La edad ideal para ser madre ha sido determinada por los investigadores como la edad que va de los 25 a 30 años (Soriano *et al.*, 2017). A partir de los 35 y sobre todo, después de los 40, las posibilidades de concebir pueden ser menores debido a la disminución de la cantidad y calidad de los óvulos ya que al nacer la mujer tiene aproximadamente un millón de óvulos, que, a lo largo de su vida fértil solo ovularan alrededor de 400 a 500 hasta que se llegue a la etapa de menopausia.

Sin embargo, la menopausia no es el único problema de infertilidad, enfermedades como el cáncer o cualquier otra enfermedad que atente contra la fertilidad es uno de los principales factores para que se recurra a Tratamientos de Reproducción Asistida (TRA), existen otros factores en los que por decisión propia de la mujer se decide postergar la maternidad.

La postergación de la maternidad está relacionada con el desarrollo personal y profesional de las mujeres en donde se introducen al mercado laboral y académico para adquirir una estabilidad económica o por ausencia de una pareja estable, como las principales variables que explican la postergación del embarazo en muchos países de Europa. (Fuentes *et al.*, 2010)

En la actualidad la decisión de ser madre es independiente de lo que tradicionalmente se ha determinado a las mujeres. A diferencia de generaciones pasadas, hoy en día las mujeres optan por el desarrollo profesional que requieren su completa dedicación antes de tener hijos.

Es por las causas anteriores que se ha recurrido a técnicas especializadas (TRA) dentro de las cuales la criopreservación de óvulos, tejido ovárico y embriones han sido propuestas para lograr esta finalidad, de ellas la congelación y vitrificación del tejido ovárico son las que han adquirido recientemente una mayor importancia en este campo.

## CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación consiste en el uso de temperaturas muy bajas para preservar células y tejidos en vida latente y estructuralmente intactos durante un largo período de tiempo. Dependiendo de los tipos de células o tejido de las diferentes especies de mamíferos, existe una gran diversidad en la respuesta criobiológica durante su congelación y el ciclo de descongelación (Gao y Critser, 2000).

El comportamiento de las células y tejidos durante su congelación se puede modificar en presencia de un crioprotector, que es un agente que afecta las tasas de transporte de agua, nucleación y crecimiento de cristales de hielo (CPA).

Los procesos de criopreservación generalmente pueden agruparse en los siguientes tipos: A) congelación lenta (Mandawala, *et al.*, 2016) en esta, las células son enfriadas muy lentamente, con una disminución de 0.3° a 2° Celsius por minuto, hasta que alcanza la temperatura final de almacenamiento de -196° Celsius (-320° Fahrenheit), B) vitrificación, que implica la solidificación de la célula o tejido de un medio acuoso en una fase vítrea no cristalina; C) almacenamiento sin congelación en condiciones bajo cero (utilizado en células hepáticas o en órganos como corazón en cerdos); y D) conservación en estado seco (Fuller, *et al.*, 2013). Generalmente, el almacenamiento de células de mamíferos en estado seco no es posible, debido a las dificultades para introducir en el citoplasma el disacárido trehalosa (disacárido de glucosa, 342 Da) y aminoácidos (molécula con un grupo amino -NH<sub>2</sub> y un grupo carboxilo -COOH) que son utilizados como crioprotectores en plantas.

Los pasos principales en la criopreservación son 1) mezcla del crioprotector (CPA) con células o tejidos antes del enfriamiento, 2) enfriamiento de las células o tejidos a baja temperatura y su almacenamiento, 3) calentamiento de las células o tejidos, y 4) la eliminación del CPA de las células o tejidos después de la descongelación (Gao, *et al.*, 2016). Por lo tanto, el uso adecuado de CPA es importante para mantener la viabilidad de la muestra a criopreservar.

La criopreservación de células reproductivas (ovocitos, espermatozoides) y tejidos (tejido ovárico y testicular) es una tecnología en desarrollo que tiene enormes implicaciones en el rápido avance de la investigación biomédica. Desde principios de la década de 1980, se han realizado avances en el establecimiento de condiciones óptimas para la maduración in vitro de los ovocitos, la fertilización y el cultivo de embriones. Estos sistemas in vitro han contribuido significativamente a la utilización de células y tejidos descongelados y han permitido evaluar protocolos diseñados para criopreservar dichos biomateriales de manera más efectiva. Aunque la criopreservación de embriones de varias especies, incluidos ratones, humanos y animales de granja, ha sido exitosa, la criopreservación de ovocitos y tejido ovárico de la mayoría de las especies de mamíferos ha sido más difícil debido a su extrema sensibilidad a condiciones sub-óptimas durante el proceso de crioconservación. La criopreservación de ovocitos de ratón ha sido bien documentada y ha resultado en un mayor éxito que los estudios con otras especies de mamíferos. Las técnicas de criopreservación y trasplante de tejido ovárico han recibido recientemente mucha atención científica debido a su gran potencial para su uso en el tratamiento de la infertilidad humana, para salvaguardar el potencial reproductivo de las especies en peligro de extinción y en el almacenamiento genómico de cepas de animales de laboratorio genéticamente importantes.

El almacenamiento de tejido ovárico en humanos también se está considerando con la esperanza de restaurar la fertilidad de las pacientes que pierden la función ovárica debido a la quimioterapia o la radioterapia durante el tratamiento del cáncer (Newton, 1998).

Las células o tejidos criopreservados poseen algunas ventajas para la investigación básica y para ser usadas en la clínica. Con la disponibilidad constante de células y tejidos criopreservados, se pueden realizar pruebas exhaustivas de calidad para

determinar la idoneidad de las células o el tejido para el trasplante sin la necesidad de obtener muestras frescas (Ibars, *et al.*, 2016) La criopreservación exitosa de células y tejidos ha aumentado gradualmente en los últimos años con el uso de los CPA y equipos de control de temperatura.

## **VITRIFICACIÓN**

La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones. La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Al ser enfriada no cristaliza, se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de ahí su nombre. Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en nitrógeno líquido (NL) no requiere más de 10 minutos (Fahy *et al.*, 1984; Rall y Fahy, 1985).

Durante la vitrificación la formación de hielo se previene mediante el uso de un enfriamiento muy rápido en soluciones acuosas de crioprotectores altamente concentrados (Kopeika *et al.*, 2015)

## **VITRIFICACIÓN DE FOLÍCULOS**

La criopreservación de folículos o tejidos ováricos se ha propuesto como una opción alternativa de preservación de la fertilidad. (Oktay y Buyuk, 2002 ). Los folículos se pueden criopreservar en secciones de tejido ovárico (Hasegawa, Hamada y Mehandjiev *et al.* 2004) o folículos individuales aislados del tejido ovárico utilizando técnicas enzimáticas o mecánicas (Carroll, Gosden, 1993). En ambas situaciones, los

folículos requerirían una maduración adicional in vivo o in vitro para que sean útiles en la restauración de la fertilidad.

Como estrategia alternativa, la criopreservación de folículos ováricos aislados tiene muchas ventajas potenciales sobre la criopreservación de tejido ovárico, primero, se espera que la permeabilidad del agente crioprotector (CPA) a través de las capas de células foliculares sea más efectiva en comparación con las secciones de tejido ovárico (Carroll, Gosden, 1993). Además, el tejido ovárico tiene una estructura más compleja con diferentes tipos de células, lo que hace que la elección de un protocolo de criopreservación adecuado sea aún más desafiante. Además, la evaluación in vitro posterior a la descongelación del ovocito-células foliculares es más fácil con folículos aislados en comparación con las secciones de tejido ovárico completas (Shaw *et al.*, 2000)

El autotrasplante de folículos criopreservados /descongelados podría dar lugar a una mejor supervivencia en comparación con las secciones de ovario, ya que la angiogénesis y la revascularización podrían ser más rápidas (Laschke *et al.*, 2002). A estos beneficios se agrega el hecho de que la lámina basal de los folículos primarios aislados excluye los capilares, células sanguíneas y células nerviosas, que sirven como barrera para prevenir la infiltración de células cancerosas en el folículo (Rodgers *et al.*, 2003). Esto podría impedir el riesgo de recurrencia del cáncer que siempre ha sido una preocupación cuando se considera el autotrasplante de tejido ovárico criopreservado/descongelado en pacientes libres de cáncer.

## **AGENTES CRIOPROTECTORES**

Los crioprotectores son moléculas que se emplean en la criopreservación para evitar las lesiones por el enfriamiento de las células. La eficacia de los crioprotectores en general depende de su solubilidad en agua y su capacidad de permanecer soluble a

bajas temperaturas, su capacidad de penetración de las membranas y compartimientos celulares, la baja toxicidad para poder ser utilizado a las altas concentraciones requeridas (Pegg, 2015), los crioprotectores se clasifican según su permeabilidad en: permeables y no permeables (Izaguirre, 2012).

**PERMEABLES O INTRACELULARES:** Son compuestos de bajo peso molecular, por ejemplo: Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger la estructura celular (Miyake, *et al.*, 1993).

**IMPERMEABLES O EXTRACELULARES:** Son compuestos de alto peso molecular, por ejemplo: polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares (Kuleshova *et al.*, 1999), estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja concentración de agua (Sommerfeld y Nieman, 1999).

## **ANTECEDENTES**

Algunas especies de animales de laboratorio son modelos importantes para desarrollar protocolos de criopreservación para el tejido ovárico humano (Quinn y Kerin, 1986). Los ratones, ratas y conejos generalmente se eligen porque alcanzan la pubertad en un breve período de tiempo, tienen un ciclo reproductivo corto y producen varios ovocitos maduros por ciclo estral. Sin embargo, la investigación relacionada con la mejora de la capacidad de reproducción en los ovarios de mamíferos también tiene otros propósitos en la actualidad, como dilucidar vías y mecanismos activos en los tejidos reproductivos y generar criobancos de células germinales para especies en riesgo o en peligro de

extinción (Lermen *et al.*, 2009). En humanos, la criopreservación de folículos preantrales del ovario puede tener diferentes propósitos, se ha demostrado ser una excelente opción para salvaguardar la fertilidad futura de la mujer, por ello existen tres importantes indicaciones para criopreservar el tejido ovárico: enfermedades malignas o afecciones benignas que amenazan la fertilidad, el deseo de posponer la maternidad o la menopausia prematura.

La vitrificación es un procedimiento bien aceptado para la criopreservación de gametos y embriones. Sin embargo, se sabe poco sobre su efecto en la preservación de tejido y en especial del ovárico, para el cual la congelación lenta es lo que se usa convencionalmente. En la actualidad se está centrando un interés creciente en el uso de la vitrificación, pero aún no existen protocolos estándar para su uso en tejido ovárico. En parte, esto se debe a la variedad de tipos de células y la naturaleza compleja del tejido ovárico. Debido a los resultados obtenidos cuando la vitrificación se ha aplicado con éxito en la conservación de blastocistos y ovocitos humanos, de tejido ovárico de roedores, animales domésticos y primates no humanos (Amorim *et al.*, 2011), ésta representa una alternativa para la criopreservación con respecto a la congelación lenta. La vitrificación previene la formación de cristales de hielo y reduce el riesgo de daño mecánico a las células en comparación con la congelación lenta, además, es un proceso simple que ahorra tiempo y no requiere equipos especiales o costosos.

Klocke *et al.*, (2014) compararon las técnicas de vitrificación y congelación lenta a través del daño criogénico en tejido ovárico en pacientes pre- menopáusicas. Los autores determinaron que no hubo diferencia significativa entre ambas técnicas en la proporción de folículos recuperados del tejido después de desvitrificación y descongelación (72.7% contra 66.7%  $p = 0.733$ ), en cuanto a la secreción de estradiol fue similar entre ambos tejidos (área bajo la curva 5.411 contra 13.102,  $p = 0,11$ ). Por lo que concluyen que la congelación lenta y vitrificación producen folículos

morfológicamente intactos por lo que, cualquiera de las dos técnicas se puede emplear en la criopreservación de tejido ovárico.

Algunos autores reportan buenos resultados al utilizar curvas de enfriamiento controlado en presencia de distintos CPA permeables como el dimetilsulfóxido, etilenglicol, propilenglicol y glicerol, (Gandolfi *et al.*, 2006); otros sostienen que la vitrificación es más eficiente. Sea enfriamiento gradual o vitrificación, los CPA mencionados cumplen la función de reemplazar el agua intracitoplasmática, disminuyendo la formación de cristales de hielo en el interior de la célula. La mayoría de los medios de crioconservación incluyen CPA no permeables y suero fetal. Fabbri y colaboradores demostraron que estas sustancias preservan la integridad estructural y funcional de la membrana celular. La sacarosa (CPA no permeable), por ejemplo, modifica el gradiente osmótico promoviendo la deshidratación celular e inhibiendo la formación de cristales intracelulares (Santos *et al.*, 2006). Algunos estudios han demostrado que también estabiliza los fosfolípidos presentes en la membrana celular e incrementa la supervivencia celular luego de la descongelación (Zhang *et al.*, 2010).

Gabriel *et. al* (2011) vitrificaron tejido ovárico porcino para conservar los ovocitos presentes en folículos preantrales (FPA) utilizando diferentes crioprotectores (Etilenglicol, DMSO y la combinación de ambos con sacarosa). Los resultados arrojaron que en FPA primordiales el etilenglicol resultó ser el crioprotector con mejores resultados, debido a que obtuvieron menos alteraciones morfológicas (control: 87%; etilenglicol 52%; DMSO 17% y etilenglicol + DMSO: 26% *Friedman, p<0,05*), mientras que en los FPA primarios el tratamiento con etilenglicol resultó menos tóxico (Control: 70%; etilenglicol: 34%), también observaron que el uso creciente de concentraciones de sacarosa en los crioprotectores disminuyó significativamente el porcentaje de folículos primordiales normales (Control : 64%; 0 M: 48%; 0,25 M: 42%; 0,75 M: 12%; 1 M: 9%) concluyendo que el mejor medio para la vitrificación resultó ser TCM 199-Hepes con 30% etilenglicol y 0 o 0,25 M de sacarosa.

Mientras que el cultivo de tejido ovárico conserva las interacciones folículo-folículo, así como las interacciones entre los folículos y las células del estroma circundante, el cultivo de folículos como unidades aisladas elimina las posibles señales paracrinas de las células del estroma o entre los folículos, pero, permite una difusión más fácil de los nutrientes y facilita el análisis de la morfología folicular y las secreciones hormonales (Gosden *et al.*, 1993).

La microdissección de los folículos preantrales se ha realizado en ratón (Nayudu y Osborn, 1992; Spears *et al.*, 1994; Cortvrindt *et al.*, 1996), rata (Daniel *et al.*, 1989), gato (Jewgenow y Stolte, 1995), ovinos (Cecconi *et al.*, 1999), bovinos (Guttierrez *et al.*, 2000) y humanos (Abir *et al.*, 1997). Esta técnica mantiene la integridad de la estructura folicular: la membrana basal todavía está presente después del procedimiento y se retienen las interacciones teca-granulosa-ovocito. Sin embargo, la microdissección de los folículos preantrales lleva mucho tiempo y es laboriosa cuando se realiza en la corteza ovárica en humanos y mamíferos grandes.

Independientemente de las condiciones de cultivo, no se conoce el impacto de la técnica de aislamiento en la morfología folicular y la esteroidogénesis posteriores, en la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario debido a la falta de estudios comparativos entre las dos técnicas.

Demeestere *et al.* (2002) evaluaron el efecto de dos procedimientos de aislamiento de folículos preantrales de ratón (mecánico y enzimático). Los resultados que obtuvieron, después de 12 días de cultivo, fue que la tasa de supervivencia del folículo fue mayor en el grupo con aislamiento mecánico en comparación con el grupo de aislamiento enzimático (94,1% y 76,4% respectivamente,  $P = 0.05$ ) sin embargo observaron que a los 12 días de cultivo se formó una cavidad antral, definida como un espacio claro que aparece dentro de las células de la granulosa en el 24,1% de los folículos supervivientes del grupo aislados mecánicamente y en el 62,3% de los folículos supervivientes del grupo aislados enzimáticamente ( $P = 0.05$ ). En cuanto a fertilización obtuvieron que con la técnica de aislamiento mecánico el 50% de los embriones en

etapa de 2 células de los ovocitos previamente obtenidos de los folículos preantrales, alcanzaron la etapa de blastocisto después de 5 días de cultivo (NS;  $P = 0,05$ ), mientras que en la técnica de aislamiento enzimático obtuvo el 40%. Después de analizar los resultados los autores concluyen que ambas técnicas son viables para realizarse en humanos sin embargo la técnica de aislamiento mecánico tiene que investigarse más debido a que esta técnica resulta más laboriosa y puede ocasionar daño morfológico, debido a la manipulación directa con el folículo.

Así mismo Lopes *et. al* (2020) evaluaron la morfología, tasa de viabilidad y desarrollo, en folículos secundarios y folículos antrales tempranos, en caprinos, al utilizar el aislamiento mecánico para la obtención de los folículos y su posterior vitrificación.

Los autores obtuvieron datos los cuales no presentaron diferencias significativas en morfología y formación del antro en ambas categorías foliculares después de su desvitrificación y fueron similares a los controles (no vitrificados), sin embargo al final del cultivo el diámetro de los folículos antrales tempranos fue mayor ( $314 \pm 45 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0.05$ ) al de los folículos secundarios vitrificados ( $259 \pm 58\mu\text{m}$ ) ( $P < 0.05$ ). Con respecto a la viabilidad al utilizar calceína y bromuro de etidio, se demostró que la viabilidad folicular no difirió ( $P > 0.05$ ) entre folículos no vitrificados y vitrificados, en ambas categorías foliculares (antral secundario y temprano) pero el porcentaje de folículos secundarios viables (frescos o vitrificados) fue mayor ( $P < 0.05$ ) que el porcentaje de folículos antrales tempranos viables.

En cuanto a la integridad de las TZP (Proyecciones Transzonales) observaron que en folículos secundarios no se afectaron mientras que en folículos antrales tempranos si hubo pérdida de TZP. Con respecto a la función esteroidogénica de los folículos observaron una tinción positiva para la enzima aromatasa p450 en ambas categorías foliculares, lo que indica que la función hormonal se mantiene en los folículos después de la vitrificación. Los autores concluyeron que los folículos secundarios fueron los más resistentes al proceso de vitrificación en comparación con los folículos antrales.

Es por lo antes mencionado y debido a la utilidad que representa la criopreservación de folículos es de importancia seguir investigando diferentes técnicas que aseguren la

viabilidad de los ovocitos al ser criopreservados en los folículos. Por lo anterior, en éste proyecto se experimento con dos modalidades de vitrificación (rápida y ultrarrápida) y el uso de dos crioprotectores, para ello se trabajó con folículos preantrales y antrales aislados mecánicamente de ovario de ratón, y determinó si alguna de estas metodologías mantiene la viabilidad y morfología de los folículos después de la vitrificación, para contribuir a la criopreservación de los ovocitos.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La criopreservación es una técnica que ha cobrado relevancia ya que es una opción adecuada para preservar células gaméticas durante un periodo de tiempo largo.

Dentro de la criopreservación se encuentran diversas técnicas, una de ellas es la vitrificación, la cual es utilizada por su bajo costo, buenos resultados y la rapidez con la que se realiza. Esta técnica se ha utilizado principalmente para ovocitos, embriones y recientemente tejido ovárico, dentro del cual se encuentran los diferentes estadios de folículos.

La vitrificación de folículos ováricos como unidades aisladas en los estadios preantral y antral ha sido poco estudiada, así como los crioprotectores adecuados para la vitrificación de los mismos, debido a que están formados por diferentes tipos de células y entre ellas, el ovocito. Por ello es importante investigar sobre esta técnica y su posible uso como una opción para preservar la fertilidad de las mujeres que deseen postergar su maternidad por cualquier motivo.

Los resultados obtenidos aportaran información acerca de la efectividad de la vitrificación y el tipo de crioprotector adecuado para la criopreservación de folículos y abrir el camino para que en un futuro se preserve parte del tejido ovárico y con ello contribuir a la preservación de la fertilidad y por ende la maternidad para las mujeres, así como la criopreservación de ovarios de animales en peligro de extinción.

## **JUSTIFICACIÓN**

Existen diversos estudios sobre criopreservación en tejido ovárico, los cuales han empleado en su mayoría la técnica de congelación, la cual es utilizada en ovocitos, blastocistos y recientemente en folículos ováricos, sin embargo esta técnica requiere de congeladores programables de alto costo y es más tardada, ya que el procedimiento puede durar hasta dos horas, por lo cual una alternativa para la criopreservación de tejidos y en este caso de folículos ováricos, es la vitrificación rápida y ultrarrápida ya que en ellas se requiere solo de nitrógeno líquido en un tanque de aluminio y el proceso dura tan solo unos minutos. Estas técnicas han mostrado resultados alentadores en la preservación de células al utilizar diferentes crioprotectores permeables y no permeables (CPA), entre los que se encuentran el etilenglicol, dimetilsulfóxido y sacarosa, que se han utilizado solos o combinados.

La preservación de tejido ovárico, es más difícil debido a la variedad de tipos celulares que lo constituyen, además de llevar a cabo el recambio del agua por el crioprotector en todas ellas. Por ello en el presente estudio se evaluaron las técnicas de vitrificación rápida y ultrarrápida de folículos preantrales y antrales aislados mecánicamente, con el uso de dos crioprotectores que en su fórmula combinen permeables y no permeables para preservar los diferentes tipos celulares del folículo, entre ellos el ovocito. Para ello se evaluó el daño criogénico al analizar la morfología y viabilidad del folículo. Estos resultados nos aportarán información sobre esta metodología y su efectividad para la criopreservación folicular exitosa.

## **HIPÓTESIS**

La criopreservación de folículos preantrales y antrales de ovario de la cepa CD-1 por la técnica de vitrificación con dos diferentes crioprotectores, no afectará la morfología y viabilidad los folículos.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el uso de dos crioprotectores para la preservación por vitrificación rápida y ultrarrápida de folículos preantrales y antrales de ovario de hembras adultas de la cepa CD-1

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Estudiar el uso de la combinación de DMSO y Sacarosa como crioprotector sobre la recuperación de la viabilidad de folículos preantrales y antrales de ovario de hembras adultas de la cepa CD-1 después de su criopreservación por vitrificación.
2. Estudiar el uso de la combinación de Etilenglicol y sacarosa como crioprotector sobre la recuperación de la viabilidad de folículos preantrales y antrales de ovario de hembras adultas de la cepa CD-1 después de su criopreservación por vitrificación.
3. Estudiar dos técnicas de vitrificación (rápida y ultrarrápida) para la criopreservación de folículos preantrales y antrales de ovario de hembras adultas de la cepa CD-1 y la recuperación de su viabilidad.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

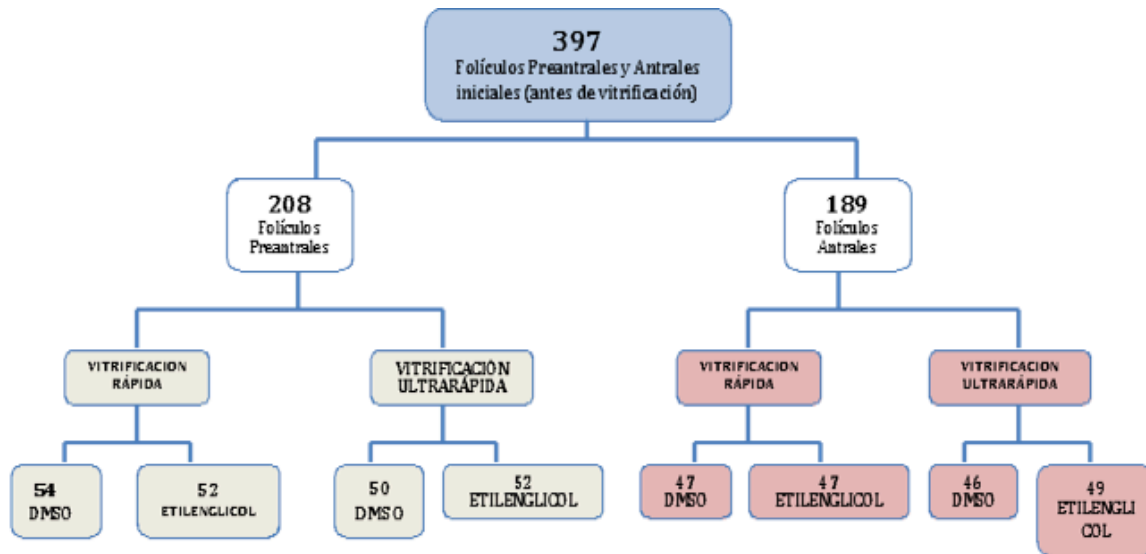
El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron un total de 24 ratones hembra de la cepa CD-1, de 10 semanas de edad. A lo largo del estudio los animales asignados permanecieron bajo el cuidado y mantenimiento del personal calificado que labora en el Bioterio Claude Bernard de la BUAP. El MVZ responsable es el Dr. Francisco Ramos Collazo, Director del Bioterio, con número de Cédula Profesional: 6519572.

Los animales estuvieron en condiciones estándar de Bioterio, con libre acceso al agua y alimento. Se realizaron 12 experimentos y en cada uno de ellos se utilizaron dos hembras. Los experimentos realizados se ajustaron a la NOM-062-ZOO-1999, la cual tiene por objeto establecer y uniformar las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio que deben cumplir las personas físicas o morales relacionadas en todos los campos con este tipo de animales.

### **Diagrama del diseño experimental**

En los 12 experimentos se obtuvieron 397 folículos en total, los cuales se obtuvieron de 48 ovarios de hembras adultas de la cepa CD-1 (10 semanas edad), de los cuales 208 folículos fueron preantrales y 189 antrales. Los folículos se vitrificaron con ambas técnicas (rápida y ultrarápida) con el uso de los dos crioprotectores. **(Fig. 6)**

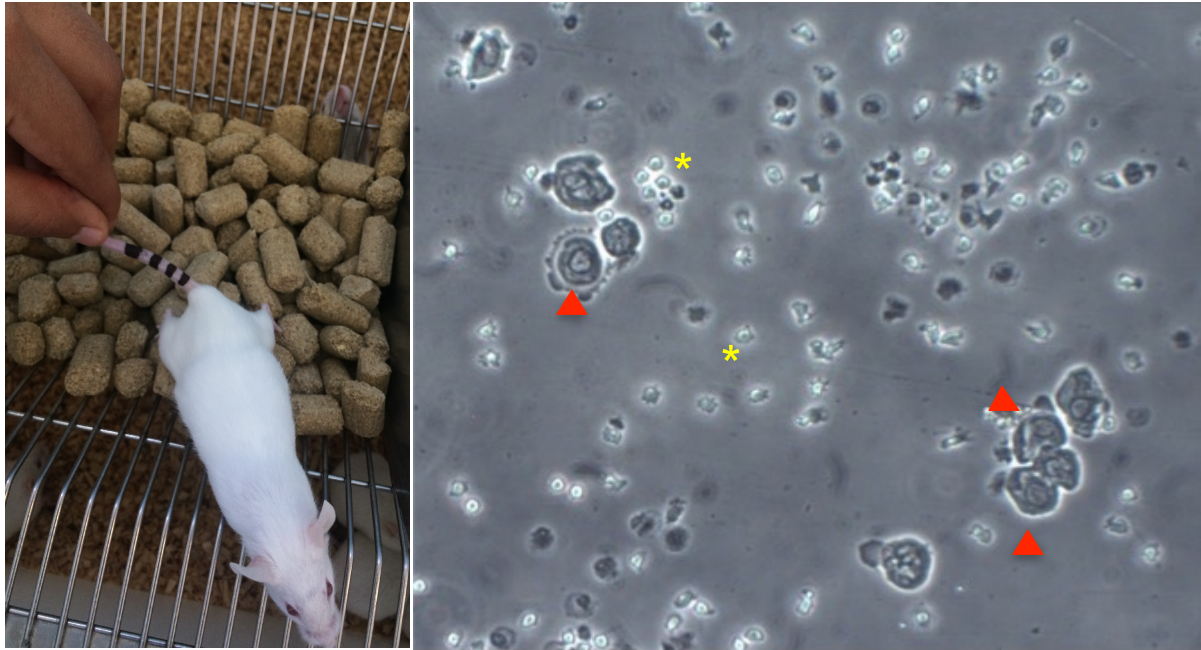


**Fig. 6.** Diagrama de trabajo que muestra el número de ovarios obtenidos para la separación y vitrificación de folículos preantrales y antrales.

## Determinación de ciclo estral

Para la determinación de la etapa del ciclo estral en la que se encontraba la hembra se realizó un frotis vaginal, para esto se tomo una muestra de exudado por el orificio vaginal de la hembra, por medio de reflujo al introducir de 2 a 3 mm una pipeta Pasteur con la punta sin filo que contenía 0.5 ml de solución salina estéril (NaCl 0.9%), esta solución, posteriormente se coloco en un portaobjetos para observarla en el microscopio óptico en contraste de fases y así determinar la fase del ciclo estral en la cual se encontraba el ratón hembra.

En cada uno de los 12 experimentos, se seleccionaron dos hembras en etapa de proestro, en la cual las células epiteliales obtenidas de la vagina se encontraron nucleadas y se observaron algunos leucocitos. **(Fig. 7)**



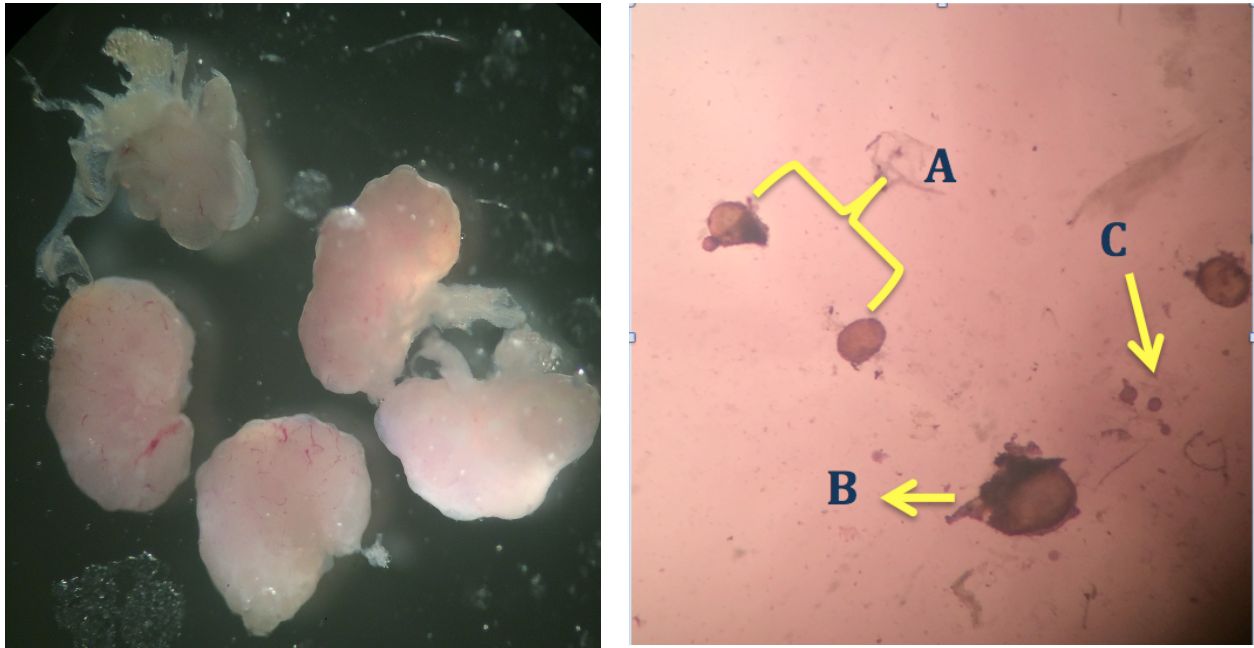
**Fig. 7.** Hembra de la cepa CD-1 en etapa de Proestro. Se observan células epiteliales nucleadas (flechas) y algunos leucocitos (asteriscos). (Microscopio invertido Nikon, objetivo 20x).

## Obtención de folículos

Para obtener los folículos, dos hembras en fase de proestro fueron sacrificadas en cámara de CO<sub>2</sub>, para ello, se utilizó 70% de CO<sub>2</sub> que provoca una pérdida rápida de la consciencia sin sufrir hipoxia, esto produce una anestesia rápida seguida de la muerte y así producir una menor irritación en vías aéreas. Posteriormente se realizó una disección abdominal para localizar y recuperar los ovarios.

Bajo un microscopio estereoscópico se observaron los ovarios y separaron los folículos en dos etapas de desarrollo: preantrales y antrales. Los folículos preantrales, se distinguieron por tener un diámetro de 200 µm y los ovocitos en su interior se encuentran rodeados de células de la granulosa, mientras que en los folículos antrales presentan un diámetro de 500 µm y en su interior se observó una cavidad conocida como antro. Los ovocitos en éstos folículos se encontraron unidos lateralmente a la parte interna del mismo (*cumulus oophorus*). Posteriormente los folículos se colocaron

en una caja petri de 3 cm de diámetro con medio Chatot-Ziomek-Bavister-Hepes (CZB-H) (Chatot *et al.*, 1989 ). (Fig. 8)



**Fig. 8.** Microfotografía de ovarios y folículos separados en diferentes etapas de desarrollo. En el panel izquierdo se observan 4 ovarios en medio CZB-Hepes, previamente libres de grasa y asas, de donde se separaron los folículos preantrales y antrales de manera individual. En el panel derecho se observan los folículos separados y clasificados para su posterior vitrificación. (A. Folículo Preantral, B. Folículo Antral, C. Folículos Primarios).

## Criopreservación

La criopreservación de los folículos se llevo cabo por 2 métodos de vitrificación; rápida y ultrarápida

Para cada método de vitrificación se utilizarán dos crioprotectores.

- **Crioprotector 1:** Dimetilsulfóxido (DMSO) 1.5 M + sacarosa 0.25 M, en medio de Chatot-Ziomek-Bavister (CZB) (Chatot *et al.*, 1989)

- **Crioprotector 2:** Etilenglicol 30% + sacarosa 0.25 M, en medio de Chatot-Ziomek-Bavister (CZB).

## Vitrificación Rápida

En cada experimento, los folículos preantrales y antrales obtenidos de los 4 ovarios se criopreservaron en 50 µl de crioprotector + 30µl de medio CZB Hepes de la siguiente manera:

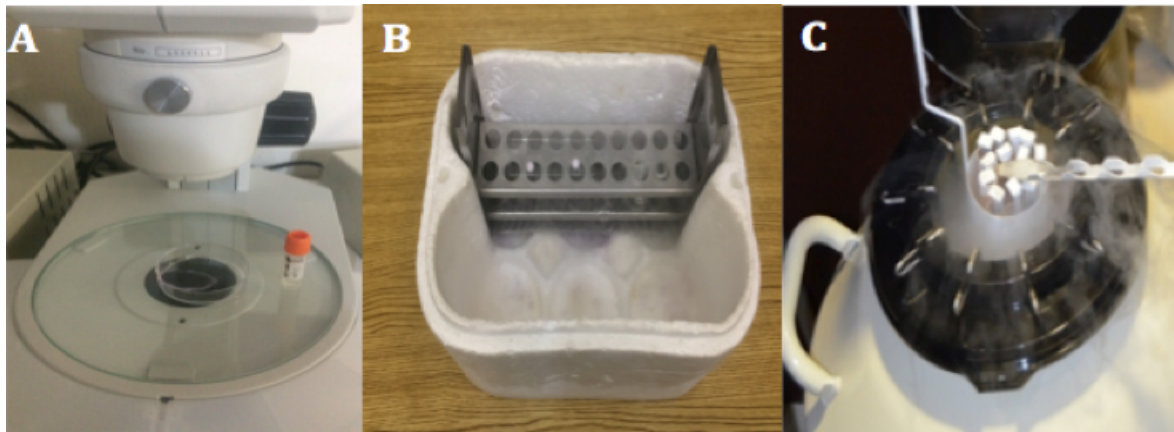
En una caja petri se incubaron los folículos durante 10 minutos con el crioprotector DMSO 1.5M + sacarosa 0.25M.

Posteriormente se colocó una gradilla metálica dentro de una caja de unicel con un poco de nitrógeno líquido y sobre la gradilla se colocó un portaobjeto (previamente lavado) en el cual con una micropipeta se depositó la mezcla de los folículos (9 folículos) y el crioprotector, formando una perla de 80 µl sobre el portaobjetos . Se dejó el tiempo necesario para que la perla solidificara y perdiera el brillo superficial.

De la misma manera se realizó la formación de las perlas con los folículos y el crioprotector compuesto por Etilenglicol al 30% + sacarosa 0.25M.

En cada experimento se elaboraron 2 perlas, 1 perla con los folículos del crioprotector 1 (DMSO), y la otra con el crioprotector 2 (Etilenglicol). Por último las perlas se recolectaron en dos crioviales diferentes, cada uno etiquetado y sellado, para posteriormente almacenarlos en un tanque de nitrógeno durante 8 días.

**(Fig. 9)**



**Fig. 9.** Criopreservación de folículos preantrales y antrales por **vitrificación rápida (A,B,C)** y **ultrarápida (A y C)**. A) Folículos sumergidos durante 10 min en el crioprotector. B) Formación de Perlas por los vapores de nitrógeno líquido, las cuales contienen los folículos antrales y preantrales y el crioprotector . El procedimiento se realiza sobre un portaobjeto colocado en una gradilla sumergida en N<sub>2</sub>L. C) criovial con los folículos colocado en una varilla para ser sumergido y almacenado en el tanque con nitrógeno.

## Vitrificación Ultrarápida

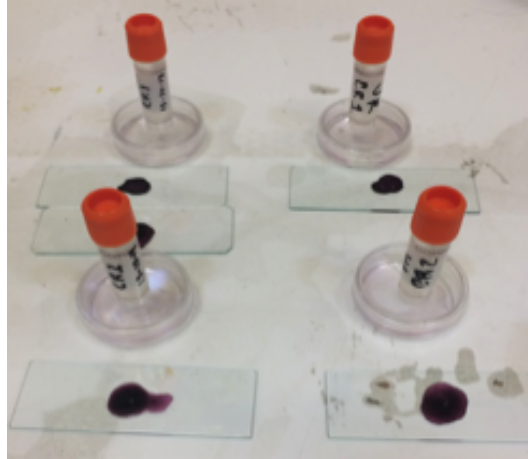
Para la vitrificación ultrarápida de los folículos preantrales y antrales contenidos en 30 µl de medio CZB, se incubaron en una caja Petri por 10 minutos con 50 µl del crioprotector 1 (DMSO 1.5 M + sacarosa 0.25 M). Posteriormente, la mezcla de los folículos y el crioprotector se pasaron con una micropipeta a un criovial (previamente etiquetado), se tapó y sumergió rápidamente en el taque con nitrógeno líquido para almacenarlo por 8 días. De la misma manera se realizó la criopreservación ultrarrápida con el crioprotector 2 (Etilenglicol al 30% + sacarosa 0.25 M (**Fig. 9**)).

## Desvitrificación

A los 8 días de almacenaje en N<sub>2</sub>L los folículos preantrales y antrales de ratones de la cepa CD-1 se desvitrificaron. Para ello se retiraron los crioviales del tanque de nitrógeno, se le agregó a cada uno 1 ml de medio (CZB) a 37°C, y se incubaron en

una estufa a 37°C en atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> por 10 minutos. Posteriormente se depositó el contenido de los crioviales en una caja petri de 3 cm de diámetro y se observó bajo un microscopio estereoscópico la viabilidad y morfología de los folículos.

(Fig. 10)



**Fig. 10.** Los crioviales que contienen los folículos criopreservados fueron retirados del tanque de nitrógeno después de su almacenamiento por 8 días, se desvitrificaron a 37°C y los folículos recuperados se colocaron en un portaobjetos con eosina-nigrosina para determinar su viabilidad y morfología.

## VIABILIDAD

Para determinar la viabilidad celular, los folículos fueron colocados con una micropipeta en un portaobjetos escavado con 100µl de medio CZB, e inmediatamente se les agregó 20µl de eosina nigrosina al 5% (colorante vital), el cual no penetra a través de la membrana intacta de los folículos y ovocitos. Al microscopio óptico, estas células se observan sin teñir o incoloras, mientras que los folículos y ovocitos con daño en su membrana (muertos) se teñirán de color rosa (eosina) por la penetración del colorante. Después de realizar esta tinción se evaluó bajo un microscopio óptico invertido el porcentaje de folículos viables (no teñidos) y no viables (teñidos).

## RESULTADOS

En el presente trabajo se estudiaron un total de 433 folículos de los cuales 208 fueron folículos preantrales y 189 fueron antrales, los cuales se vitrificaron por la técnica rápida y ultrarápida utilizando 2 crioprotectores diferentes. (Tabla 1.)

Folículos Preantrales				Folículos Antrales			
VR		VUR		VR		VUR	
DMSO	Etilenglicol	DMSO	Etilenglicol	DMSO	Etilenglicol	DMSO	Etilenglicol
<b>54</b>	<b>52</b>	<b>50</b>	<b>52</b>	<b>47</b>	<b>47</b>	<b>46</b>	<b>49</b>

**Tabla 1.** Valores que representan el número de folículos preantrales y antrales criopreservados por Vitricación Rápida y Vitricación Ultrarápida en los crioprotectores 1 (DMSO) y 2 (Etilenglicol).

## RECUPERACIÓN DE LOS FOLÍCULOS DESPUÉS DE SU DESVITRIFICACIÓN

Después de realizar el proceso de desvitrificación, se determinó el número de folículos que fueron recuperados en cada experimento, es decir aquellos folículos que no se destruyeron durante el procedimiento, tanto preantrales y antrales, y que fueron tratados con los dos diferentes crioprotectores para su criopreservación.

El porcentaje de folículos preantrales recuperados después de la técnica de **vitricación rápida** con el **crioprotector 1 (DMSO)** fue del **80%** mientras que con el **crioprotector 2 (ETILENGLICOL)** el porcentaje de folículos fue de **60%**. En comparación con la técnica de **vitricación ultrarápida** los porcentajes fueron, **con el crioprotector 1 (DMSO)** fue del **58%**, mientras que con el **crioprotector 2 (ETILENGLICOL)** fue del **80%**. **Tanto DMSO como Etilenglicol mostraron los porcentajes más altos, ambos obtuvieron 80% con vitricación rápida y ultrarápida respectivamente.**

En cuanto a los folículos antrales, al emplear la metodología de **vitricación rápida** con el **crioprotector 1 (DMSO)** y el **crioprotector 2 (ETILENGLICOL)** se obtuvo el

mismo porcentaje de **77%**. Por lo que no hubo diferencias entre los dos crioprotectores con este tipo de vitrificación. En cuanto a la **vitrificación ultrarrápida** con el **crioprotector 1 (DMSO)** se encontraron **72%** de los folículos en comparación con el **crioprotector 2 (ETILENGLICOL)** en el que se recuperaron un **88%**, por lo que en folículos antrales se obtuvo que la técnica y crioprotector con mejor porcentaje de recuperación fue la técnica de **vitrificación ultrarrápida al utilizar el crioprotector 2** (Etilenglicol 30% + sacarosa 0.25 M, en medio CZB). (**Tabla 2.**)

RECUPERADOS				
CRIPROTECTOR	VR		VUR	
	PREANTRALES	ANTRALES	PREANTRALES	ANTRALES
DMSO	80%	77%	58%	72%
ETILENGLICOL	60%	77%	80%	88%

**Tabla 2.** Valores que representan el porcentaje de folículos preantrales y antrales recuperados después de la vitrificación con los dos tipos de metodología utilizada (rápida y ultrarrápida) y los dos diferentes crioprotectores.

\*VR=Vitrificación rápida

VUR= Vitrificación ultrarrápida

Los porcentajes obtenidos, sugieren que ambos crioprotectores, DMSO y etilenglicol preservan en mayor proporción a folículos preantrales (80%), utilizando ambas técnicas de vitrificación, sea rápida o ultrarrápida.

En cuanto a folículos antrales la técnica de vitrificación ultrarrápida con Etilenglicol como crioprotector **preservan en una mayor proporción** estructural (88%) a estos folículos.

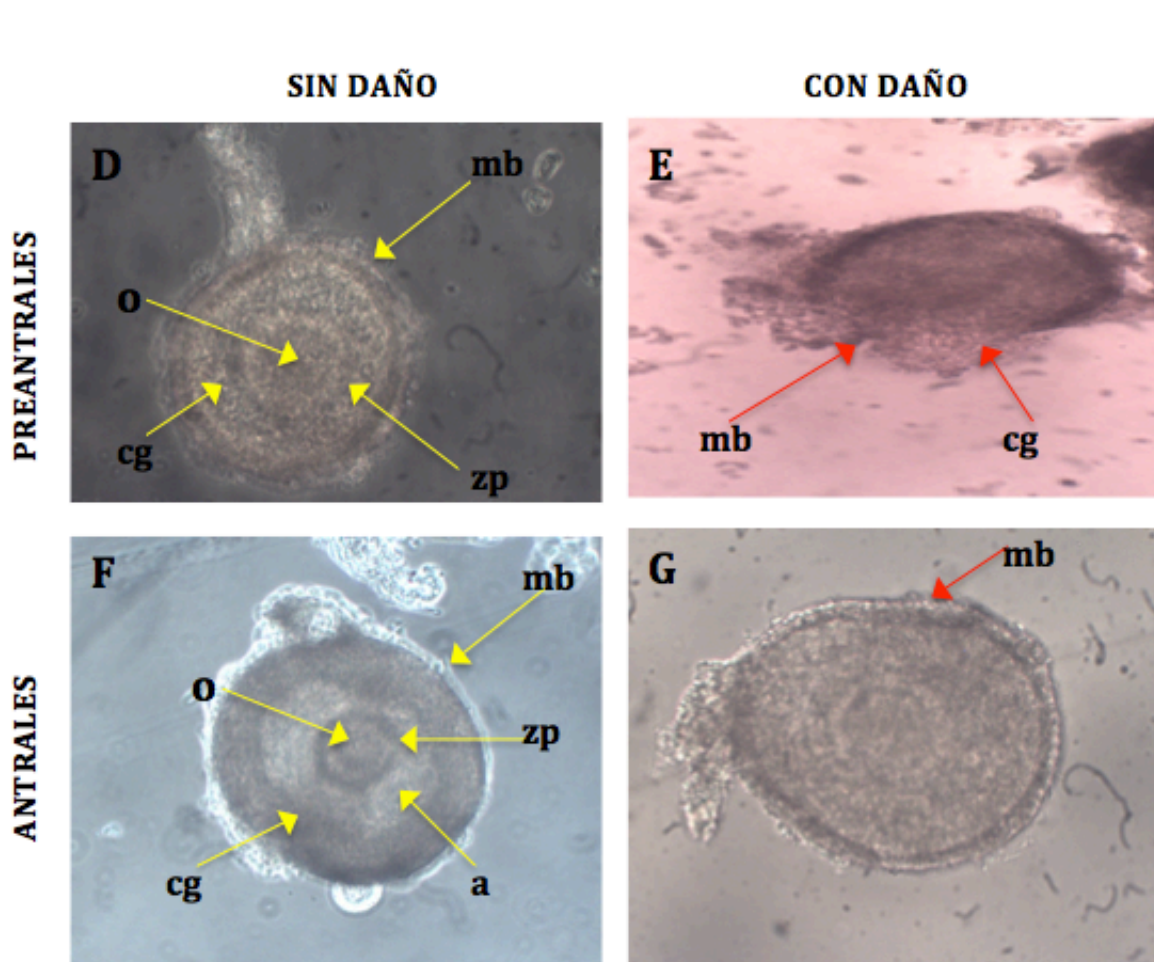
## MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD DE FOLÍCULOS DESVITRIFICADOS

En cuanto a la morfología y viabilidad de los folículos recuperados se encontraron que eran viables los que

presentaban una forma esférica u ovoide con membrana basal regular, en algunos se observó el ovocito dentro sin presentar vacuolización, o daño evidente en la zona pelúcida y en las células de la granulosa. La morfología se determinó al observar, si los

folículos recuperaban su forma original (antes de la vitrificación) o si existía algún daño o cambio en las células del folículo.

Los daños morfológicos más evidentes que se observaron fueron en la membrana basal, ovocito, zona pelúcida y células de la granulosa. **(Fig. 11)**



**Fig. 11.** Microfotografías de contraste de fases de folículos antrales y preantrales desvitrificados. **(D)** folículo preantral desvitrificado sin daño morfológico aparente, membrana basal regular, ovocito visible, sin vacuolizaciones, zona pelúcida sin irregularidades y células de la granulosa distribuidas de manera homogénea. **(E)** folículo con daño evidente en la membrana basal y células de la granulosa, **(F)** Folículo antral sin daño morfológico aparente, membrana basal regular, ovocito visible, sin vacuolizaciones, zona pelúcida sin irregularidades, antro visible. **(G)** Folículo antral con membrana basal irregular y la presencia de un ovocito con forma irregular, (Microscopio invertido Nikkon, objetivo 20x)

En cuanto a la determinación de la viabilidad de los folículos se estableció un tiempo de 10 segundos para observarlos al microscopio, desde el momento en el que se agregaba eosina nigrosina a los folículos y la observación de la posible tinción de los mismos. (Fig. 12)

El Porcentaje de viabilidad obtenido en folículos preantrales con la técnica de **vitrificación rápida** y el crioprotector 1 (**DMSO**) fue de **77%**, en comparación con el **crioprotector 2 (Etilenglicol)** en donde la viabilidad fue del **65%**. Mientras que con la **vitrificación ultrarrápida** utilizando el **crioprotector 1 (DMSO)** fue de **86%**, y con el **crioprotector 2 (Etilenglicol)** el porcentaje fue de **71%** de viabilidad.

La viabilidad de los folículos antrales después de su desvitrificación se obtuvieron porcentajes similares con ambos crioprotectores, con la técnica de **vitrificación rápida** y el **crioprotector 1 (DMSO)** se obtuvo un **81% de folículos viables** y con el **crioprotector 2 (Etilenglicol)** fue de **94%**. Mientras que con la **vitrificación ultrarrápida** al utilizar el **crioprotector 1 (DMSO)** el porcentaje de viabilidad fue de **88%**, y con el crioprotector 2 (**Etilenglicol**) fue de **74%**.

(Tabla 3).

VIABILIDAD				
	VR		VUR	
CRIPROTECTOR	PREANTRALES	ANTRALES	PREANTRALES	ANTRALES
<b>DMSO</b>	77%	81%	86%	88%
<b>ETILENGLICOL</b>	65%	94%	71%	74%

**Tabla 3.** Valores que representan el porcentaje de folículos preantrales y antrales recuperados viables después de las dos técnicas de vitrificación y los dos diferentes crioprotectores.

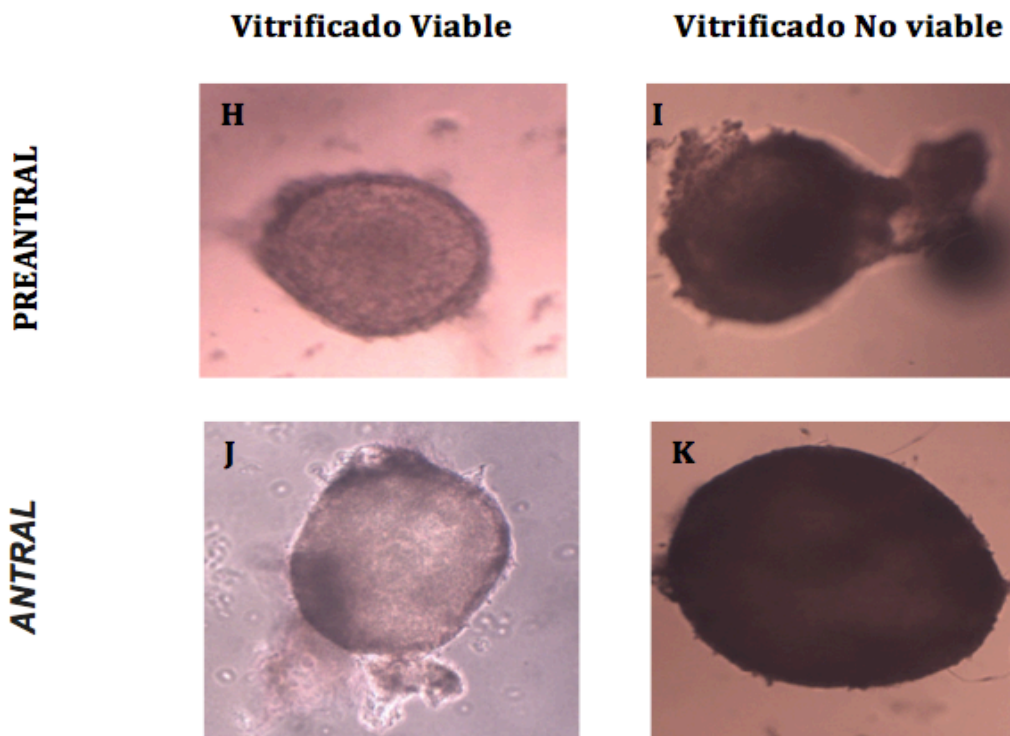
\*VR=Vitrificación rápida

VUR= Vitrificación ultrarrápida

Los resultados obtenidos en cuanto a viabilidad sugieren que en folículos preantrales con la técnica de vitrificación ultrarrápida con el crioprotector compuesto por DMSO preservan mejor la integridad, viabilidad y estructura de los folículos (86%).

En cuanto a folículos antrales la técnica de vitrificación rápida con el crioprotector compuesto por etilenglicol (94%), **preservan mejor la integridad, viabilidad y estructura de los folículos.**

**Sin embargo, en los folículos antrales y preantrales obtuvieron porcentajes altos al utilizar DMSO en ambas técnicas de vitrificación en comparación con los tratados con etilenglicol como crioprotector.**



**Fig. 12.** *Imágenes representativas de folículos preantrales y antrales vivos y muertos después de ser vitrificados y evaluados con eosina nigrosina.*

*(H y K) folículos viables, se observan células transparentes dentro del folículo*

*(J K) folículos no viables, presentan tinción intensa en toda la estructura del folículo.*

*(Microscopio invertido Nikon, objetivo 20X).*

Al inicio de la experimentación (experimentos 1 y 2) se criopreservaron folículos primordiales, sin embargo se observó que no era posible criopreservarlos de manera aislada debido a que la mayoría de estos folículos después de desvitrificarlos se

asumió que se desintegraban debido a que ya no se encontraban en el criovial, otra razón fue el daño causado por la manipulación mecánica al tratar de separarlos de otros folículos, por lo que se decidió que en posteriores experimentos algunos folículos primordiales se vitrificaran en grupo, es decir, asociados a otros folículos ya sea preantrales o antrales.

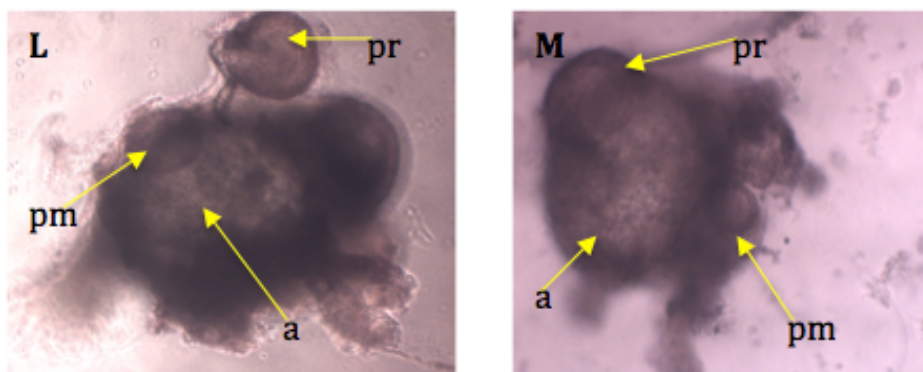
Por lo tanto en los experimentos posteriores se vitrificaron un total de **36 folículos primordiales** en grupo sin ser aislados de otros folículos (**Tabla 4.**) Estos folículos se analizaron en cuanto a viabilidad y morfología.

Folículos primordiales No aislados				
	VR		VUR	
CRIPROTECTOR	PREANTRALES	ANTRALES	PREANTRALES	ANTRALES
DMSO	7%	14%	14%	14%
ETILENGLICOL	11%	11%	18%	11%

**Tabla 4.** Porcentaje de folículos primordiales viables con los diferentes crioprotectores y técnicas de vitrificación.

De acuerdo a los resultados obtenidos el porcentaje más alto es el de folículos primordiales no aislados de folículos preantrales (18%) con el uso del crioprotector compuesto de etilenglicol utilizando la técnica de vitrificación ultrarápida.

Sin embargo, en general los folículos primordiales vitrificados en grupo soportan ambas técnicas de vitrificación. (**Fig. 13**)



**Fig. 13.** Imágenes representativas de folículos primordiales viables vitrificados en grupo sin ser aislados mecánicamente. Tinción moderada en membrana basal de folículos primordiales, preantrales y antrales con células transparentes en la parte interna de los folículos lo que indica viabilidad.

\*pm= Folículo primordial

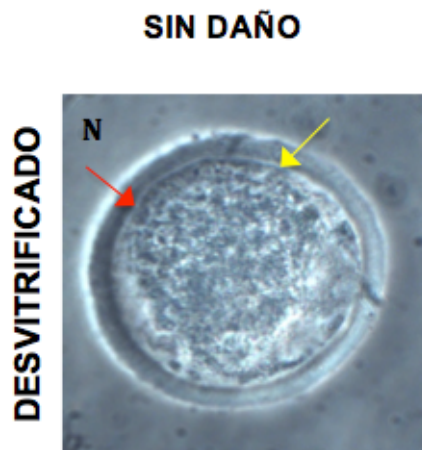
\*pr= Folículo preantral

\*a=Folículo antral

Debido a que algunos folículos no soportaban la vitrificación, estos liberaban al ovocito de su interior, por lo que se analizó su estado. Se encontraron un total de 20 ovocitos en algunos de los experimentos, 11 ovocitos fueron de folículos preantrales, 6 de folículos antrales y 3 de folículos primordiales que se vitrificaban junto con los folículos, a los cuales se analizó su viabilidad y morfología.

Los ovocitos encontrados tuvieron algún daño morfológico aparente en diferentes estructuras, las más recurrentes fueron en la **membrana plasmática, zona pelúcida, y citoplasma. (Fig. 14)**

Otros ovocitos no tuvieron daños morfológicos aparentes o se encontraban inmaduros, sin embargo todos los ovocitos fueron inviables debido a que se tiñeron después del parámetro del tiempo establecido (10 segundos), sin embargo sería importante realizar otras pruebas de viabilidad ya que si el folículo no se preserva estructuralmente el



ovocito no se mantiene viable.

**Fig. 14.** Microfotografía de contraste de fases de ovocito normal recuperado de folículo antral, después de la desvitrificación. El ovocito muestra citoplasma uniforme

(flecha roja), sin ninguna alteración aparente en membrana plasmática y zona pelúcida (flecha amarilla). Microscopio invertido Nikon, objetivo 40X)

## DISCUSIÓN

La criopreservación de folículos de ovario es una técnica que se ha ido desarrollado en los últimos años, a pesar de ello, esta técnica ha ampliado las alternativas en cuanto a reproducción en mamíferos, ya que permite la preservación de la fertilidad y especies en peligro de extinción, sin embargo al ser una técnica relativamente nueva, el protocolo es modificado constantemente, utilizando diferentes mezclas de crioprotectores y emplear vitrificación o congelación, por lo que los resultados obtenidos por algunos autores varían tanto positivamente como negativamente, ya que la criopreservación puede causar algunos daños a los folículos en cuanto a morfología y viabilidad por lo que necesario tratar de reducir estos daños y obtener un mayor porcentaje de éxito utilizando esta técnica.

En el presente trabajo se analizó el efecto de la vitrificación (rápida y ultrarápida) con DMSO Y ETILENGLICOL en folículos de ovario de ratones hembra de la cepa CD1. **La mezcla de DMSO con sacarosa** al utilizar las dos técnicas de vitrificación en ambos estadios foliculares obtuvieron en su mayoría porcentajes más altos en cuanto a viabilidad, y con menos daño morfológico ( FPA/ VR= 77%, VUR=86%, FA/VR=81%,VUR=88%) que la mezcla de sacarosa con Etilenglicol (FPA/VR=65% VUR=71%, VUR=74%) en comparación con lo reportado por *Gabriel et., al (2011)* quienes obtuvieron en FPA de tejido ovárico porcino con el uso de etilenglicol como crioprotector mejores resultados, debido a que obtuvieron menos alteraciones morfológicas que los expuestos a DMSO (control: 87% etilenglicol 52%, DMSO 17% y etilenglicol + DMSO: 26%; Friedman,  $p < 0,05$ ), mientras que en los FPA el tratamiento con etilenglicol resultó menos tóxico (Control: 70%; etilenglicol: 34%). Los autores realizaron un segundo experimento al utilizar etilenglicol + sacarosa en diferentes concentraciones dando como resultado que en cuanto al uso creciente de

concentraciones de sacarosa en los crioprotectores disminuyó significativamente el porcentaje de folículos primordiales normales (Control: 64%; 0M: 48%; 0,25M: 42%; 0,75M: 12%; 1M: 9%) sin embargo, en ausencia de sacarosa o bajas concentraciones de la misma, (0 y **0,25M**), el porcentaje de folículos normales post vitrificación fue similar, mientras que a concentraciones mayores se observó mayor efecto deletéreo (0,75M y 1,0M). En nuestro estudio solo se uso la combinación de una sola concentración de sacarosa (0.25M) en combinación con DMSO y Etilenglicol respectivamente, y los resultados obtenidos en viabilidad y morfología mostraron porcentajes superiores a 65% coincidiendo con lo mencionado por Moniruzzaman *et. al* (2009), que el uso de bajas concentraciones de sacarosa en el medio de vitrificación (hasta 0.25M) aumenta la cantidad de folículos normales después de someterlos al proceso de vitrificación, debido a que la sacarosa en un crioprotector no permeable, preserva la integridad estructural y funcional de la membrana celular e inhibe la formación de cristales intracelulares.

Los daños estructurales que sufrieron los folículos, nos permiten confirmar que cualquier técnica de vitrificación empleada produce un daño en la membrana basal liberando al ovocito y por ende provocando que este no sea viable, hecho que se observo en este estudio, por lo cual, la morfología es fundamental para que el ovocito sobreviva. Otro daño observado fue en células de la granulosa y otras estructuras tanto en el folículo como en el ovocito (membrana plasmática, citoplasma, zona pelúcida) sin importar en que estadio folicular se encuentren, esto probablemente por deshidratación de las células debido a una concentración elevada de los crioprotectores, coincidiendo con el estudio de *Gabriel et. al* (2011) en el que también reportan estos mismos daños en estas mismas estructuras del folículo en bovinos al utilizar DMSO al 30%, Etilenglicol 30% y sacarosa 0.25M (la misma concentración realizada en este estudio), sin embargo se debe considerar que debido a que las membranas ováricas varían entre especies, los crioprotectores y las concentraciones utilizadas producirían un efecto diferente en folículos de otras especies.

En cuanto al aislamiento de los folículos que se realizó de forma mecánica, para convertirlos en unidades individuales, se sugiere que esta técnica de aislamiento puede ocasionar daños en el folículo, principalmente en la membrana basal por el contacto directo de las agujas con los folículos al separarlos, y por otros factores como (1) la ausencia de estroma ovárico que actúa de sostén de los folículos; (2) el contacto de los crioprotectores y (3) las fuerzas osmóticas que actúan directamente sobre los folículos. Estos factores podrían causar daños en las proyecciones transzonales (TZP) presentes entre las células de la granulosa y el ovocito, poniendo en peligro el desarrollo del folículo y la función hormonal, sin embargo en estudios realizados por *Demeestere et., al (2002)*, evaluaron el efecto de dos procedimientos de aislamiento (mecánico y enzimático) de folículos preantrales de ratón híbrido C57bl/8jXCBA/ca, para su posterior desarrollo in vitro, determinaron el desarrollo folicular, esteroidogénesis, maduración in vitro de los ovocitos y desarrollo embrionario. Además, reportaron que la técnica de aislamiento mecánico tuvo una tasa de supervivencia de los folículos más alta en comparación con el uso de una enzima (94% y 76% respectivamente,  $P < 0,05$ ), también encontraron que se había producido una rotura de la membrana basal en el 100% de los folículos aislados enzimáticamente y sólo en el 35.9% de los folículos aislados mecánicamente después de 2 días de cultivo, no obstante reportaron que con el aislamiento folicular enzimático se obtuvo una mayor producción de testosterona, estradiol, y una reacción alcalina de fosfatasa más elevada, lo que sugiere que los folículos aislados enzimáticamente mantuvieron más células de la teca que los aislados mecánicamente, pero ambas técnicas de aislamiento dieron como resultado tasas de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario similares. En el presente estudio, se obtuvo una tasa de folículos recuperados (supervivencia) del 74% utilizando la técnica de aislamiento mecánico, no fue tan alta como la obtenida por *Demeestere* y colaboradores, esto probablemente debido, a que la interacción directamente con los folículos puede ocasionar daños más evidentes en comparación con el aislamiento enzimático, no obstante, este resultado es alentador para continuar realizando esta técnica y seguir adecuándola y perfeccionando para obtener un mayor porcentaje de éxito.

Las dos técnicas de vitrificación fueron aplicadas en este estudio en folículos preantrales y antrales de los cuales, se obtuvo que los folículos antrales tuvieron porcentajes más altos en recuperación y en la prueba de viabilidad con eosina nigrosina en comparación con los preantrales difiriendo con el estudio realizado por *Lopes et al. (2020)* en donde fueron vitrificados folículos antrales y preantrales de caprino y cultivados para después ser sometidos a pruebas de viabilidad con Calceína-AM y Azul tripán y en ambas pruebas los folículos preantrales tuvieron mayor porcentaje de viabilidad, pero al final del cultivo los folículos antrales obtuvieron un mayor diámetro folicular ( $P<0.05$ ) en comparación con los preantrales. Sin embargo en nuestro estudio a pesar de obtener mejores porcentajes en viabilidad en folículos antrales debería analizarse la actividad esteroidogénica y el estado de los ovocitos ya que al ser folículos en un estadio casi maduro aumentan los riesgos de alguna alteración genética en los ovocitos y la capacidad de estas células favorezcan una posterior reparación de los organelos y otras estructuras que pudieran dañarse después de la vitrificación.

También en el presente trabajo se vitrificaron folículos primordiales, al observar que en este tipo de folículos es difícil emplear la técnica de aislamiento mecánico para que queden en unidades independientes. Por lo anterior se procedió a vitrificarlos en grupo, es decir sin separarlos de otros folículos ya sea preantrales y antrales, a pesar de que el número de muestra fue pequeño ( $n=28$  folículos primordiales) se observó que estos folículos resistían la vitrificación debido a que conservan una relación folículo-folículo y las interacciones entre ellos y las células del estroma que les rodea (*Gosden et al., 1993; Van den Hurk et al., 2000*) por lo que de cierta manera se crea un soporte que les permite resistir el proceso de criopreservación y también se obtiene una reducción en el tiempo de aislamiento mecánico ya que al conservarlos en grupo es más rápida la disección para obtenerlos.

## CONCLUSIÓN

La criopreservación de folículos de ovario es una técnica reciente, pero ha ofrecido una buena alternativa para la conservación de especies y de fertilidad en humanos al ser utilizada en procedimientos de RA, sin embargo sigue habiendo mejoras en los protocolos de vitrificación para aumentar la tasa de viabilidad y disminuir el daño provocado por la criopreservación es por ello que el presente trabajo aporta las siguientes conclusiones:

El 94% de los folículos antrales recuperaron su viabilidad después de la desvitrificación, utilizando la técnica de vitrificación rápida y el 86% de folículos preantrales utilizando la técnica de vitrificación ultrarrápida.

La criopreservación de folículos antrales y preantrales de ratones hembras de la cepa CD-1 con el uso de DMSO y etilenglicol como crioprotectores por medio de la vitrificación rápida y ultrarrápida no afectan su viabilidad y morfología en un 74% y 65% respectivamente.

El uso de la combinación de DMSO 1.5 M + Sacarosa 0.25 M como crioprotector empleando las técnicas de vitrificación rápida o ultrarrápida criopreservan la morfología y viabilidad en 86% y 88% de los folículos preantrales y antrales respectivamente.

El uso de la combinación de Etilenglicol al 30% + Sacarosa 0.25M CZB como crioprotectores y las técnicas de vitrificación rápida o ultrarrápida criopreservan la morfología y viabilidad en 71% y 94% de los foliculares preantrales y antrales respectivamente.

## **PERSPECTIVAS**

La importancia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, contribuyen a demostrar las ventajas y desventajas de aplicar la técnica de vitrificación en folículos de ratón aislados mecánicamente, los cuales proporcionan datos importantes para que se continúen realizando más estudios y así seguir perfeccionando los protocolos de vitrificación y conocer con más profundidad el efecto de este procedimiento en tejido ovárico y folículos aislados, ya que con estos avances se tiene una opción con altas posibilidades de éxito dentro de las técnicas de Reproducción Asistida.

En nuestro estudio se sugiere la utilización del crioprotector compuesto por DMSO (DMSO 1.5M+ Sacarosa 0.25M en medio CZB) y vitrificación rápida o ultrarápida para criopreservar folículos preantrales y antrales en ratón de la cepa CD-1, no obstante sería necesario ampliar nuestro estudio proporcionando datos y resultados sobre el cultivo posterior de estos folículos para madurar los ovocitos y después poder realizar una fertilización in vitro, y así obtener más datos e información sobre la utilización de estas técnicas, y tal vez poder aplicarlas en humanos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amorim, C. A., Curaba, M., Van, L. A., Dolmans, M. M. & Donnez, J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online*. 23, 160–186 (2011).
2. Bächler, M., Menshykau, D., De Geyter, C., & Iber, D. (2013). Species-specific differences in follicular antral sizes result from diffusion-based limitations on the thickness of the granulosa cell layer. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 20(3), 208–221. doi:10.1093/molehr/gat078
3. Bloom, F. (1986). *Tratado de Histología*. Edit. Interamericana Mc Graw Hill. 1era edición, Capítulo 32, 859-907,
4. Bruzzone, R., White, T. W., & Paul, D. L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European journal of biochemistry*, 238(1), 1–27. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0001q.x>
5. Carroll, J., & Gosden, R. G. (1993). Physiology: Transplantation of frozen—thawed mouse primordial follicles. *Human Reproduction*, 8(8), 1163–1167. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138221
6. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert* (1989) 66:679-688.
7. Clarke H. J. (2018). Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 7(1), 10.1002/wdev.294. <https://doi.org/10.1002/wdev.294>
8. Couse, J. F., Yates, M. M., Walker, V. R., & Korach, K. S. (2003). Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(6), 1039–1053. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0398>
9. Demeestere, I., Delbaere, A., Gervy, C., Van Den Bergh, M., Devreker, F., & Englert, Y. (2002). Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(8), 2152–2159. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.8.2152>
10. Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383(6600), 531–535. doi:10.1038/383531a0
11. Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A., & Meryman, H. T. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21(4), 407–426. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(84\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(84)90079-8)
12. Fuentes, A., Jesam, C., Devoto, L., Angarita, B., Gallegillos, A., Torres, A., *et al.* (2010). Postergación de la maternidad en Chile: Una realidad oculta. *Revista médica de Chile*, 138(10), 1240-1245.
13. Fuller, B. J., Petrenko, A. Y., Rodriguez, J. V., Somov, A. Y., Balaban, C. L., & Guibert, E. E. (2013). Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. *Cryo letters*, 34(4), 432–452.

14. Gabriel, Paula & Torres, Pablo & J., Boviez & Cisale, Humberto & Lombardo, Daniel & Fischman, Maria. (2012). Vitrification of porcine ovarian tissue: effect of different crioprotective agents in the preservation of preantral follicles morphology. *In Vet.* 14. 87-99.
15. Gandolfi, F., Paffoni, A., Papasso Brambilla, E., Bonetti, S., Brevini, T. A., & Ragni, G. (2006). Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertility and sterility*, 85 Suppl 1, 1150–1156.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.062>
16. Gao, D., & Critser, J. K. (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR Journal*, 41(4), 187–196. doi:10.1093/ilar.41.4.187
17. Gao, H. H., Li, Z. P., Wang, H. P., Zhang, L. F., & Zhang, J. M. (2016). Cryopreservation of whole bovine ovaries: comparisons of different thawing protocols. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 204, 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.06.016>
18. Gordon-Elliott, J.S. & Ernst, C.L. & Fersh, Madeleine & Albertini, E. & Lusskin, Shari & Altemus, Margaret. (2017). The hypothalamic-pituitary-gonadal axis and women's mental health: PCOS, premenstrual dysphoric disorder, and perimenopause. *Psychiatric Times*. 34.
19. Gosden, R., Boland, N., Spears, N., Murray, A., Chapman, M., Wade, J., . . . Brown, N. (1993). The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. *Reproductive Medicine Review*, 2(3), 129-152. doi:10.1017/S0962279900000685
20. Griffin, J., Emery, B. R., Huang, I., Peterson, C. M., & Carrell, D. T. (2006). Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *Journal of experimental & clinical assisted reproduction*, 3, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-1050-3-2>
21. Hasegawa, A., Hamada, Y., Mehandjiev, T., & Koyama, K. (2004). In vitro growth and maturation as well as fertilization of mouse preantral oocytes from vitrified ovaries. *Fertility and Sterility*, 81, 824–830. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.08.028
22. Hawkins, S. M., & Matzuk, M. M. (2008). The menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135, 10–18.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1429.018>
23. Hirshfield A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International review of cytology*, 124, 43–101. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61524-7)
24. Ibars, E. P., Cortes, M., Tolosa, L., Gómez-Lechón, M. J., López, S., Castell, J. V., & Mir, J. (2016). Hepatocyte transplantation program: Lessons learned and future strategies. *World journal of gastroenterology*, 22(2), 874–886.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.874>
25. Izaguirre, Elsa. (2012). Adaptación de un método de vitrificación-Calentamiento en fibreplug para la transferencia directa de blastocistos bovinos producidos in vitro. Recuperado de <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17409/2/TFM%2520ELSA%2520IZAGUIRRE.pdf>
26. Klocke, S., Bündgen, N., Köster, F., Eichenlaub-Ritter, U., & Griesinger, G. (2014). Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 291(2), 419–426. doi:10.1007/s00404-014-

27. Kopeika, J., Thornhill, A., & Khalaf, Y. (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human reproduction update*, 21(2), 209–227.  
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmu063>
28. Laschke, M. (2002). Ovariectomy improves neovascularization and microcirculation of freely transplanted ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, 172(3), 535–544. doi:10.1677/joe.0.1720535
29. Lermen D, Blömeke B, Browne R, Clarke A, Dyce PW, Fixemer T, et al. Cryobanking of viable biomaterials: Implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular Ecology*. 2009;18(6):1030-1033. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.04062.x
30. Li, R., & Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(3), 141–152. <https://doi.org/10.1038/nrm3531>
31. Lopes, E. P. F., Rodrigues, G. Q., de Brito, D. C. C., Rocha, R. M. P., Ferreira, A. C. A., de Sá, N. A. R., ... Rodrigues, A. P. R. (2020). Vitrification of caprine secondary and early antral follicles as a perspective to preserve fertility function. *Reproductive Biology*. doi:10.1016/j.repbio.2020.05.001
32. Mandawala, A. A., Harvey, S. C., Roy, T. K., & Fowler, K. E. (2016). Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, 86(7), 1637-1644. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.07.018
33. Mayerhofer, A., & Garfield, R. E. (1995). Immunocytochemical analysis of the expression of gap junction protein connexin 43 in the rat ovary. *Molecular Reproduction and Development*, 41(3), 331–338. doi:10.1002/mrd.1080410308
34. McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
35. Miller, D. J., Shi, X., & Burkin, H. (2002). Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent progress in hormone research*, 57, 37–73.  
<https://doi.org/10.1210/rp.57.1.37>
36. Miyake, T., Kasai, M., Zhu, S. E., Sakurai, T., & Machida, T. (1993). Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology*, 40(1), 121–134.  
[https://doi.org/10.1016/0093-691x\(93\)90346-7](https://doi.org/10.1016/0093-691x(93)90346-7)
37. Moniruzzaman, M., Bao, R.-M., Taketsuru, H., & Miyano, T. (2009). Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*, 72(2), 280–288. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.01.024
38. Mora, J. M., Fenwick, M. A., Castle, L., Baithun, M., Ryder, T. A., Mobberley, M., Carzaniga, R., Franks, S., & Hardy, K. (2012). Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles. *Biology of reproduction*, 86(5), 153–14. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096156>
39. Newton H. (1998). The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. *Human reproduction update*, 4(3), 237–247.  
<https://doi.org/10.1093/humupd/4.3.237>

40. Oktay, K., & Buyuk, E. (2002). The potential of ovarian tissue transplant to preserve fertility. *Expert opinion on biological therapy*, 2(4), 361–370. <https://doi.org/10.1517/14712598.2.4.361>
41. Parborell, M.Fernanda A.(2002). Regulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico por un agonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3460\\_Parborell.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3460_Parborell.pdf)
42. Pegg D. E. (2015). Principles of cryopreservation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1257, 3–19. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_1)
43. Peters H, Byskov AG, Lintem-Moore S, Faber M, Andersen M. (1973). The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J Reprod Fertil.* 35(1),139-41.
44. Quinn, P., & Kerin, J. F. P. (1986). Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 3(1), 40–45.[doi:10.1007/bf01131379](https://doi.org/10.1007/bf01131379)
45. Richards JS. (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev.* 60(1):51-89.
46. Rodgers, R., Irving-Rodgers, H., & Russell, D. (2003). Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction*, 126(4), 415–424.[doi:10.1530/rep.0.1260415](https://doi.org/10.1530/rep.0.1260415)
47. Rojas Quintana, P., Medina Tío, D., & Torres Ajá, L. (2011). Infertilidad. *Medisur*, 9(4), 340-350. Recuperado de <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1692/7340>
48. Shaw, J. M., Oranratnachai, A., & Trounson, A. O. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53(1), 59–72. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00240-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00240-x)
49. Simon, A. M., Chen, H., & Jackson, C. L. (2006). Cx37 and Cx43 localize to zona pellucida in mouse ovarian follicles. *Cell communication & adhesion*, 13(1-2), 61–77. <https://doi.org/10.1080/15419060600631748>
50. Sommerfeld, V., & Niemann, H. (1999). Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38(2), 95–105. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2159>
51. Soriano, KP., Carballo E., Roque AM., Duran L., Kably A., (2017). Percepción de la fertilidad. *Ginecol Obstet.* 85(6), 364-373.
52. Vadakkadath Meethal, S., & Atwood, C. S. (2005). The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(3), 257–270. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4381-3>
53. Van Voorhis.(1999).*Encyclopedia of Reproduction II*: 376-389
54. Wassarman, P. M., Jovine, L., & Litscher, E. S. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology*, 3(2), E59–E64. [doi:10.1038/35055178](https://doi.org/10.1038/35055178)
55. Zhang, J. M., Liu, X. L., Yang, Y. X., & Wan, X. P. (2010). Comparisons of different protocols for vitrifying mouse ovarian tissue. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 45(4), 694–698. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01332.x>