



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

“Eficiencia de la criopreservación para la conservación de tejido ovárico
cortical bovino.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A

Jadiel Leonel Cisneros Prado

TUTOR:

Felipe Montiel Palacios
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Carlos Salvador Galina Hidalgo
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
Juan Heberth Hernández Medrano
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Ciudad universitaria, CD. MX. Marzo 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Dedicado a DIOS por darme la oportunidad de buscarle y conocerle un poco más día a día, mediante los principales regalos que me ha dado y son:

Mis amados padres, que han sido, son y seguirán siendo pilares fundamentales de mi vida y superación personal. Por ser el ejemplo a seguir de un verdadero hogar a pesar de todo y por enseñarme que los sueños son posibles cuando la Fe, el Amor, la Paciencia y la Disciplina son parte de nuestro ser.

Mi esposa e hija, que son una razón más de inspiración para no desistir en la vida.

Por todo cuanto puedo y soy gracias DIOS.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada para la realización de mis estudios.

Al posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal de la FMVZ-UNAM, por darme la oportunidad de formar parte de una generación más en ésta máxima casa de estudios.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana, campus Veracruz, por haberme alojado en sus instalaciones en donde encontré lo necesario para crecer humana y profesionalmente. En esta institución también encontré el apoyo incondicional de muchas personas para llevar a cabo esta investigación, principalmente de mi tutor el Dr. Felipe Montiel Palacios, el Dr. Rodolfo Canseco Sedano, la M.C. Guadalupe Vega Rubio, la M.C. Rosa María Cordero Pulido y el ya Dr. Oscar Enrique Zárate Guevara.

A los tablajeros del Rastro “TUMFA” del municipio de Manlio Fabio Altamirano, Ver., por acceder a la donación de ovarios de vaca para realizar ésta investigación.

Al laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina Human de la Universidad Cristóbal Colon campus Calasanz, a cargo del Teniente Juan Antonio López Orozco, quien con dedicación y amistad me instruyo en las técnicas de evaluación histológicas.

Al Centro de Diagnóstico Ginecológico “CDXG FERTILIZACIÓN IN VITRO” y a su grupo de Embriólogos los doctores Rodolfo Canseco Sedano y Oscar Enrique Zárate Guevara por su tiempo, amistad e incondicional apoyo en la enseñanza de los procesos de cultivo y criopreservación.

Al Laboratorio de Fertilización In Vitro en la Escuela de Estudios Agropecuarios Mezcalapa de la Universidad Autónoma de Chiapas y al Dr. Leonardo Gordillo Páez, por su apoyo y amistad durante el proceso de cultivo.

Al Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM por los espacios de trabajo, y en especial al Dr. Horacio Merchant Larios por su apoyo incondicional y por la oportunidad de aprender e integrarme a su equipo. Al M.C. Alejandro Marmolejo Valencia y a la MVZ. Adriana Castro Domínguez por su asistencia técnica. A Paulina, Andrea y Pedro. A todo el equipo por su invaluable amistad que hizo que cada día de trabajo fuera un grato momento para compartir.

A la señora Silvia Siria Guzmán Gutiérrez quien me vio como un hijo más y brindó atenciones y amistad en las buenas y en las malas, y a su apreciable familia con la cual surgió una fervorosa amistad.

ÍNDICE

RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vii
TRABAJOS GENERADOS DE ESTA TESIS.....	ix
DECLARACIÓN.....	x
1.0 CAPITULO 1.....	11
1.1 REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
1.1.1 Criopreservación de tejido ovárico cortical (TOC)	11
1.1.2 Agentes crioprotectores.....	12
1.1.3 Métodos de criopreservación	13
1.1.4 Reanudación de la foliculogénesis	18
1.1.5 Cultivo <i>in vitro</i> celular.....	21
1.2 JUSTIFICACIÓN GENERAL.....	23
1.3 HIPÓTESIS.....	23
1.4 OBJETIVO GENERAL.....	24
1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2.0 CAPITULO 2.....	25
3.0 CAPITULO 3.....	37
3.1 RESUMEN	38
3.2 INTRODUCCIÓN	39
3.3 MATERIAL Y MÉTODOS	40
3.3.1 Recolección, transporte y preparación de tejido ovárico cortical bovino	40
3.3.2 Criopreservación de TOC bovino.....	40
3.3.2.1 Curva lenta/descongelación.....	40
3.3.2.2 Vitricación/calentamiento	41
3.3.2.2.1 Vitricación convencional (VC).....	41
3.3.2.2.2 Vitricación directa en funda (VDF)	41
3.3.3 Análisis de la morfología de folículos preantrales bovinos.....	41
3.3.4 Análisis de la viabilidad de folículos preantrales bovinos.....	42
3.3.5 Análisis ultraestructural de folículos preantrales bovinos	42
3.3.6 Análisis estadístico.....	43
3.4 RESULTADOS.....	44
3.4.1 Análisis de la morfología folicular	44
3.4.2 Análisis de la viabilidad folicular.....	46
3.4.3 Análisis de la ultra-estructura folicular	48
3.4.3.1 Folículos preantrales bovinos no criopreservados (Control)	48
3.4.3.2 Folículos preantrales bovinos criopreservados.....	53
3.5 Discusión	61
3.6 Conclusiones.....	64
4.0 CAPITULO 4.....	65
4.1 INTRODUCCIÓN	66
4.2 MATERIAL Y MÉTODOS	67
4.2.1 Preparación de muestras.....	67
4.2.2 Criopreservación de TOC bovino mediante curva lenta y descongelación	67
4.2.3 Criopreservación de TOC bovino mediante vitricación y calentamiento.....	67
4.2.3.1 Vitricación convencional (VC).....	67
4.2.3.2 Vitricación directa en funda (VDF)	68
4.2.4 Aislamiento y evaluación de la viabilidad con azul tripan	68
4.2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos preantrales bovinos procedentes de TOC fresco y descongelado/calentado.....	69
4.2.6 Ultraestructura de folículos preantrales bovinos cultivados <i>in vitro</i>	69
4.2.7 Análisis estadístico Experimental	70
4.3 RESULTADOS.....	70
4.5 DISCUSIÓN	74
5.0 REFERENCIAS.....	76

RESUMEN

La reproducción asistida en la especie bovina es una herramienta que ha permitido avanzar a pasos agigantados en el sector productivo y reproductivo. Desde sus inicios en la inseminación artificial, criopreservación de espermatozoides y ovocitos MII, maduración de ovocitos y fertilización *in vitro*, hasta llegar a procesos mas complejos como la criopreservación de tejido ovárico cortical (TOC), con la cual aún existen muchas dudas por resolver en el mejoramiento de técnicas. La presente investigación aborda la importancia de las alteraciones causadas en los folículos preantrales, presentes en el TOC de la especie bovina previo a la criopreservación y posterior a revertir el proceso, en cuatro capítulos.

El primer capítulo recopila una revisión de literatura relacionada con la criopreservación y sus alcances obtenidos en bovinos y otras especies.

El segundo capítulo presenta la publicación denominada “Ultrastructure of bovine preantral follicles: effect of the slaughter house aseptic process on follicular integrity”. Aquí se aborda al método aséptico y las condiciones impuestas sobre el TOC como factor de tipo pivotante para el éxito de la criopreservación de TOC. Se indica como la asépsia inadecuada puede afectar irreversiblemente durante la colección y transporte de ovarios, al comprometer la integridad ultraestructural de los folículos preantrales bovinos, con repercusiones que impiden que estos presenten una oportunidad para utilizarse en procesos de criopreservación o cultivo *in vitro*.

El tercer capítulo (artículo en preparación) aborda los efectos causados por los métodos de curva lenta (distintos crioprotectores: etilenglicol [EG], dimetilsulfoxido [DMSO] y glicerol [GLI]) y de vitrificación (dos variantes, convencional [VC] y directa en funda [VDF]) sobre la integridad y viabilidad de los folículos preantrales del TOC bovino mediante tres análisis. Uno de morfología mediante cortes histológicos teñidos con hematoxilina & eosina. Aquí se valoró el número, estadio de desarrollo y calidad de acuerdo con los aspectos morfológicos generales de los folículos preantrales presentes en TOC. El análisis no encontró diferencia en el número de folículos primarios y secundarios calidad buena entre tratamientos, pero si para los primordiales del grupo control y los tratados con DMSO en el método de curva lenta. El segundo análisis determinó el número de folículos viables, mediante la tinción supravital de azul tripan que permitió identificar que el número promedio de folículos preantrales viables no fue diferente entre tratamientos. El tercer análisis evaluó la ultraestructura folículo preantral y determinó que en los tratamientos EG y VDF, se causó el menor número de daños ultraestructurales en células de la granulosa y ovocito. El interesante y poco descrito proceso de autofagia en ovocitos de folículos preantrales, fue observado y descrito en todos los tratamientos, como regulador de la homeostasis.

El cuarto capítulo corresponde a la evaluación del cultivo *in vitro* de folículos preantrales aislados provenientes de TOC bovino previamente criopreservado. Previo al cultivo se determinó la viabilidad de los folículos aislados con azul tripan. Todos los viables de cada tratamiento se cultivaron por 8 y 16 días y se analizaron mediante microscopia electrónica de transmisión. Solo dos folículos integros fueron encontrados para el grupo control al día 8 de cultivo. Mientras que los folículos, previamente criopreservados, al día 8 de cultivo y los del día 16 en todos los tratamientos y su respectivo control, degeneraron y solo detritus celulares fueron observados. Los factores que condijeron a este resultado pueden estar asociados principalmete al medio de cultivo, cuya composición quizá no fue la adecuada

para los folículos preantrales bovinos. En conclusión, los estudios realizados demuestran que los folículos preantrales poseen una elevada sensibilidad a los procesos previos y posteriores a la criopreservación, pero es posible preservar su integridad y viabilidad mediante vitrificación y curva lenta, bajo los protocolos usados en esta investigación. Sin embargo, es necesaria más investigación respecto a las necesidades de los folículos aislados de TOC bovino, previamente criopreservado, destinados a cultivo.

Palabras clave: criopreservación, ultraestructura, autofagia, bovino, folículo preantral, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Assisted reproduction in the bovine species is a tool that has made it possible to advance in leaps and bounds in the productive and reproductive sector. Since its inception in artificial insemination, cryopreservation of sperm and MII oocytes, oocyte maturation and in vitro fertilization, to reach more complex processes such as cryopreservation of cortical ovarian tissue (COT), with which there are still many doubts to be resolved in the improvement of techniques. The present investigation addresses the importance of the alterations caused in the preantral follicles, present in the COT of the bovine species prior to the cryopreservation and after reversing the process, in four chapters.

The first chapter compiles a literature review related to cryopreservation and its scopes obtained in cattle and other species.

The second chapter presents the publication called "Ultrastructure of bovine preantral follicles: effect of slaughter house aseptic process on follicular integrity". Here, the aseptic method and the conditions imposed on COT as a pivotal factor for the success of cryopreservation of COT are addressed. It is indicated how inadequate asepsis can irreversibly affect the collection and transport of ovaries, by compromising the ultrastructural integrity of bovine preantral follicles, with repercussions that prevent them from presenting an opportunity to be used in cryopreservation or in vitro culture.

The third chapter (paper in preparation) addresses the effects caused by the slow freezing methods (different cryoprotectants: ethylene glycol [EG], dimethylsulfoxide [DMSO] and glycerol [GLI]) and vitrification methods (two variants, conventional [CV] and direct cover [DCV]) on the integrity and viability of preantral follicles of bovine COT by three analyzes. One of morphology through histological sections stained with hematoxylin & eosin. Here the number, stage of development and quality according to the general morphological aspects of the preantral follicles present in COT was evaluated. The analysis found no difference in the number of primary and secondary follicles, good quality between treatments, but for the primordial of the control group and those treated with DMSO in the slow freezing method. The second analysis determined the number of viable follicles, by supravital staining of trypan blue that allowed to identify that the average number of viable preantral follicles was not different between treatments. The third analysis evaluated the preantral follicle ultrastructure and determined that in the EG and VDF treatments, the smallest number of ultrastructural damages was caused in granulosa and oocyte cells. The interesting and little-described process of autophagy in oocytes of preantral follicles was observed and described in all treatments, as a regulator of homeostasis.

The fourth chapter evaluated the in vitro culture of isolated preantral follicles from bovine COT previously cryopreserved. Before the culture, the viability of the follicles isolated with trypan blue was determined. All viable of each treatment were cultured for 8 and 16 days and analyzed by transmission electron microscopy. Only two integrous follicles were found for the control group at day 8 of culture. While the follicles, previously cryopreserved, on day 8 of culture and those of day 16 in all the treatments and their respective control, degenerated and only cellular detritus were observed. The factors that led to this result may be mainly associated with the culture medium, whose composition may not have been adequate for preantral bovine follicles. In conclusion, the studies carried out show that preantral follicles have a high sensitivity to the processes prior to and after cryopreservation, but it is possible to preserve their integrity and viability through vitrification and slow curves, under the protocols used in this research. However, more

research is needed regarding the needs of isolated bovine COT follicles, previously cryopreserved, destined for culture.

Keywords: cryopreservation, ultrastructure, autophagy, bovine, preantral follicle, *in vitro* culture.

TRABAJOS GENERADOS DE ESTA TESIS

TRABAJOS EN CONGRESOS:

Jadiel Leonel Cisneros Prado, Felipe Montiel Palacios, Rodolfo Canseco Sedano, Horacio Merchant Larios. Efecto del Proceso Aséptico en Rastro Sobre la Integridad. Ultra-Estructural de Folículos Bovinos Preantrales. IX Congreso del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. FMVZ-UNAM 2016.

MCA. **Cisneros-Prado Jadiel Leonel**, MCA. Zarate-Guevara Oscar Enrique, Dr. Montiel-Palacios Felipe, Dr. Canseco-Sedano Rodolfo. Criopreservación de Tejido Ovárico Bovino: Morfología y Viabilidad de Folículos Inmaduros. 53° Congreso Mexicano de Medicina de la Reproducción. Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción (2016).

DIRECCIÓN DE TESIS DE LICENCIATURA

Alumno: Víctor Manuel Escobedo Serrano. Tema de tesis “Etilenglicol como agente crioprotector en tejido ovárico bovino”. Tesis Publicada. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Noviembre 2015.

Alumna: Elideth Hernández Bello. “Efecto crioprotector del glicerol en tejido ovárico bovino”. Tesis publicada. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero. Febrero 2016.

ARTICULOS EN REVISTAS INDEXADAS

Publicados:

Cisneros Prado JL, Montiel Palacios F, Canseco Sedano R, Merchant Larios H. Ultrastructure of bovine preantral follicles: effect of the slaughterhouse aseptic process on follicular integrity. *Veterinaria México OA*. 2017;4(2). doi: 10.21753/vmoa.4.2.424.

En preparación:

Cisneros Prado JL, Zárate Guevara OE, Montiel Palacios F, Canseco Sedano R, Merchant Larios H. Effects cryoprotectants of slow freezing and vitrification methods in preantral follicles from bovine-ovarian tissue cortical obtained from slaughterhouse.

DECLARACIÓN

El autor de esta investigación da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de intercambio bibliotecario o quien desee una copia.

JADIEL LEONEL CISNEROS PRADO

1.0 CAPITULO 1

1.1 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1.1 Criopreservación de tejido ovárico cortical (TOC)

La preservación de TOC bovino tiene como objetivo conservar simultáneamente miles de folículos preantrales procedentes de la población finita de la corteza del ovario. Lo cual se considera como una alternativa o suplemento de la criopreservación de ovocitos maduros y/o embriones (ASRM, 2006), con enfoque principal en conservar los recursos genéticos animales, ofreciendo bancos de germoplasma mejorado para la propagación de animales valiosos y/o especies en peligro de extinción (Wildt, 2000).

A diferencia de los ovocitos completamente desarrollados, los ovocitos de los folículos preantrales presentes en el TOC parecen tolerar bien la criopreservación (Shaw *et al.*, 2000). Los ovocitos, dentro de los folículos preantrales poseen características que deben hacerlos menos vulnerables a crío-lesiones, que aquellos ovocitos maduros. Estas características son: 1) el pequeño tamaño de los ovocitos y sus células de apoyo; 2) baja tasa metabólica; 3) la fase del ciclo celular (detenidos en la profase de la meiosis I); 4) la ausencia de una zona pelúcida y la falta de gránulos corticales periféricos y; 5) la pequeña cantidad de lípidos intracitoplásmicos sensibles al frío (Gosden *et al.*, 1994). Sin embargo, la criopreservación de TOC puede ofrecer aún más ventajas, porque su recolección no depende de la edad o de la fase del ciclo estrual de la hembra, e incluso se puede aplicar a los animales que mueren inesperadamente (Shaw *et al.*, 2000) o en animales pre-púberes (ASRM, 2006). Con esto, la preservación de ovarios completos, corteza ovárica o aislamiento de folículos podría ser utilizada de manera más eficiente para preservar los gametos de hembras, aumentando así el pool genético (Baudot *et al.*, 2007), no obstante, la preservación de TOC desde el punto de vista criobiológico es difícil de alcanzar con éxito total, debido a que contiene cierto tipo de células y componentes específicos de la matriz extracelular (Hovatta, 2005). Sin embargo, y a pesar de no estar bien definidos los factores que afectan la criopreservación de este tipo de tejido, existen reportes sobre desarrollo y maduración de ovocitos procedentes de TOC criopreservado en ratones (Candy *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Kagawa *et al.*, 2007), ratas (Wang *et al.*, 2002); conejos (Almodin *et al.*, 2004); ovejas (Bordes *et al.*, 2005; Imhof *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006); bovinos (Lucci *et al.*, 2004), e incluso individuos nacidos vivos por esta novedosa técnica aplicada de forma experimental en humanos (Schmidt *et al.*, 2003; Von Wolff *et al.*, 2009), con estos resultados se indica el potencial que podría desarrollar esta tecnología tanto en animales como en humanos. Respecto a la especie humana, los resultados exitosos de esta técnica en desarrollo también, pueden permitir asistir a aquellas mujeres diagnosticadas con cáncer, previo a ser sometidas a tratamientos radio y quimioterapéuticos, los cuales las conducen a una infertilidad o esterilidad, debido a que los ovarios son elevadamente sensibles a tratamientos citotóxicos, de esta forma se preservaría la fertilidad de la paciente, quien en un futuro al superar dicha enfermedad pueda tener la opción de procrear (Donnez *et al.*, 2006).

Investigaciones asociadas con la criopreservación de TOC en diversas especies han determinado que el tiempo requerido en el proceso de obtención de cortezas ováricas se

encuentra relacionado con las severas pérdidas de folículos primordiales normales a corto y largo plazo, debido a los daños ocasionados por la isquemia que se produce a nivel celular, y la magnitud del daño esta correlacionado con la duración de ésta isquemia durante su proceso de obtención (Demirci *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Courbiere *et al.*, 2005). Por lo anterior, el lapso de tiempo que transcurra desde la obtención de los tejidos hasta su preservación, no debería superar las 2 a 4 horas (Baudot *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2009). Sin embargo, en un estudio realizado por Celestino *et al.* (2008), no observaron diferencia en mantener TOC en solución de NaCl a 20°C por una hora (protocolo 1) ó a 4°C por 24 h (protocolo 2) sobre la viabilidad folicular (74 vs 77%). En un trabajo previo, (Celestino *et al.*, 2007) se observaron resultados similares al preservar fragmentos ováricos de bovino a 4°C por un periodo de 18 a 24 h en solución de NaCl al 0.9%, donde el porcentaje de viabilidad folicular no fue estadísticamente diferente al observado en el grupo control (75 vs 76%). Con estos resultados, se confirmó que la baja tasa metabólica de los folículos preantrales del TOC, posibilita su mantenimiento a bajas temperaturas (4 a 20°C) de manera esencial y así permite preservar su viabilidad por un periodo de tiempo más prolongado, luego de su recolección, previo al inicio de los procedimientos rutinarios en laboratorio (Lopes *et al.*, 2009).

1.1.2 Agentes crioprotectores

Durante el proceso de criopreservación, la temperatura declina y conforme avanza la fase de enfriamiento, el agua del medio inicia su cristalización (Gao and Critser, 2000). Una vez iniciada la cristalización, se continúa con la liberación de energía en forma de calor latente o de fusión, que es necesaria para aumentar la temperatura y alcanzar un punto de equilibrio entre la solidificación simultánea de las fracciones no cristalizadas (agua y solutos) en sólidos (hidratos). A este punto de equilibrio también se le conoce como punto eutéctico de cristalización (Han and Bischof, 2004).

El proceso eutéctico durante el enfriamiento induce serios daños a las estructuras vitales en los organismos biológicos (Hopkins *et al.*, 2012). En orden de prevenir la formación eutéctica, variados componentes se han utilizado como agentes crioprotectores (ACP's), en los cuales se incluyen el etilenglicol, dimetil sulfóxido y glicerol (permeables) y algunos azúcares (no permeables) (Cui *et al.*, 2007; Neto *et al.*, 2008; Braslavsky *et al.*, 2012). En general los crioprotectores son usados para proteger a las células durante el proceso de descenso de temperatura hasta alcanzar los -196 °C y posterior retorno a condiciones fisiológicas, mediante mitigación de los daños causados por la cristalización eutéctica (Díez *et al.*, 2012).

En ambos procesos de criopreservación (CL y VT), el primer paso en la preservación de células y tejidos es el desplazamiento de los ACP's permeables hacia el interior de ellos, pues el éxito del protocolo en particular normalmente dependerá de la concentración de ACP's que incidan en las células o tejidos mediante un proceso de equilibrio termodinámico con su entorno. En caso contrario, el equilibrio termodinámico también conduce a la remoción de crioprotectores permeables mediante una solución de dilución al finalizar el proceso de preservación cuando las células o tejidos se encuentran en buenas condiciones para ser utilizados (Elmoazzen and McGann, 2005).

Desde la introducción del glicerol como ACP, seguido por el uso de dimetil sulfóxido y el etilenglicol, células y tejidos se han criopreservado con resultados variables, casi siempre derivando de métodos empíricos (Vajta and Nagy, 2006). Al evaluar los procesos, la mayoría de ellos utilizan protocolos de criopreservación en donde las células se mantienen en suspensión bajo concentraciones molares de ACP's, los cuales les confieren cierto tipo de flexibilidad durante la criopreservación. Sin embargo, esos crioprotectores al mismo tiempo pueden causar severos daños por cambio de presión osmótica durante su adición o remoción, y si se sobrepasa la concentración requerida de ACP, existirán mayores posibilidades de daño irreversible a nivel celular (Lawson *et al.*, 2011). Debido a que la mayor parte de las membranas son permeables a moléculas de agua y ACP's, ambos flujos de elementos se han de llevar a cabo simultáneamente tanto a nivel intra como extracelular, con ciertas variaciones en el transporte de solutos (Elmoazzen and Mcgann, 2005).

Debido a que el exceso de solutos permeables puede inducir formación de núcleos de hielo, surge la importante necesidad de adicionar solutos impermeables, (que son azúcares como: glucosa, sucrosa, rafinosa, etc), quienes confieren actividad protectora contra el deterioro de las moléculas biológicas a bajas temperaturas, así como prevenir el excesivo aumento osmótico (hinchazón) durante la remoción de crioprotectores durante el periodo de descongelación/calentamiento, previamente confirmado (Furuki, 2000).

1.1.3 Métodos de criopreservación

Las técnicas de criopreservación utilizadas para tejidos biológicos son: la congelación convencional o curva lenta (CL) y el enfriamiento ultra-rápido o vitrificación (VT) (Faheem *et al.*, 2011). Ambas técnicas requieren que las células o tejidos se sometan a un proceso de deshidratación y permitan la asimilación citosólica o no de los crioprotectores (permeables y no permeables, respectivamente) que las rodean, previo a su inmersión a temperaturas bajo cero (Alabedalkarim *et al.*, 2012; Ting *et al.*, 2012), éste proceso favorecerá el paso inmediato por el margen de inestabilidad térmica del tejido, que se da entre los $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por lo tanto, durante los procedimientos de congelación ó enfriamiento (respectivamente), las células se exponen a diversas fuerzas (térmicas, químicas y mecánicas), que pueden interferir con sus funciones normales (Baudot *et al.*, 2007). Aunque las células enfriadas y ya almacenadas en nitrógeno líquido (N_2L) pueden mantener su viabilidad por muchos años, la velocidad con la que se lleve a cabo el deshielo ó calentamiento, influirá directamente en la sobrevivencia de las mismas, ya que la velocidad del cambio de temperatura ha de controlar el transporte del agua a través de la membrana celular y de ahí, indirectamente la probabilidad de enfriamiento intracelular (Woods *et al.*, 2004). Las principales causas de lesiones crio-inducidas se darán por la formación de cristales de hielo intracelular y por depósitos de sales, por lo tanto, el daño ocasionado por el proceso de descenso de temperatura puede hacerse más notorio y ocurrir durante la fase de retorno a condiciones fisiológicas, debido a que los cambios en la composición de su entorno, han de posibilitar la mediación de fugas temporales en la membrana plasmática (Kim *et al.*, 2001). Todos estos cambios han de variar de acuerdo al método aplicado, sea CL o VT.

En la CL, tanto la pérdida de agua y la asimilación de crioprotectores se llevan a cabo gradualmente durante un periodo de equilibrio (10 a 20 min) y conforme se enfría el tejido en su medio crioprotector, durante éste momento se desencadena un proceso gradual de crecimiento de cristales de hielo intra y extracelulares (Han and Bischof, 2004). La ventaja de la CL es que las células sólo son expuestas a mayor volumen de un crioprotector y en baja concentración del mismo, por lo cual la toxicidad es reducida, luego se inicia el descenso de temperatura gradual a una velocidad que puede oscilar desde los -0.3 a -2 °C por min, con ayuda de una congeladora automática, minimizando con ello su actividad metabólica hasta alcanzar los -30 ó -35 °C, momento en el cual los dispositivos de almacenamiento que contienen a los tejidos, se sumergen directo al N₂L (Aerts *et al.*, 2008; Celestino *et al.*, 2008).

En la VT, la pérdida de agua y la permeabilidad de los crioprotectores tienden a llevarse a cabo antes de iniciar el enfriamiento debido a que el proceso de descenso de temperatura es demasiado rápido y no se procede a la formación de cristales de hielo (Kuwayama, 2007). En cuanto a la ventaja de la VT es que el daño físico asociado con la formación y crecimiento de cristales de hielo y el daño osmótico causado por el derretimiento del mismo, son reducidos o evitados, no obstante, durante el proceso de VT se exponen los organismos a una rápida deshidratación en una elevada concentración de crioprotectores (permeables y no permeables), que pueden ser potencialmente tóxicos a temperatura ambiente en donde el metabolismo celular es estable, de ahí, la sobrevivencia dependerá del tiempo mínimo requerido en que sean sumergidos en N₂L (-196°C), es por eso que el descenso de temperatura debe ser inmediato alcanzando velocidades de enfriamiento de hasta 30,000 °C por min para evitar las alteraciones toxicas por sobre exposición, formando un estado amorfo, también llamado fase solida vítrea sin presencia de cristales de hielo (Yavin y Arav, 2007; Paris *et al.*, 2009).

Ambos procedimientos son aplicables y tienden a ser utilizados para preservar células aisladas, tejidos y órganos (Baudot *et al.*, 2007), pero aún no está claramente definido que método es el ideal que pueda preservar eficientemente las cortezas de TOC. Entre las razones de estas divergencias, se sabe que el TOC está compuesto por una diversidad de tipos celulares que poseen diferentes requerimientos para una óptima sobrevivencia (Choi *et al.*, 2007). Otro aspecto a considerar es la variación de tamaños inter e intra-tipos celulares dentro del mismo tejido, debido a que se han observado procesos de enucleación esporádica en células idénticas durante la criopreservación, evidenciando que aquellas células con un mismo ciclo de enfriamiento tienden a acelerar o retrasar la enucleación de cuerpos de hielo según su tamaño; donde, las células de mayor tamaño se caracterizan por un menor volumen de contacto de su superficie radial al crioprotector, que aquellas células pequeñas. Por tanto, se espera que las células de mayor tamaño pierdan menos agua vía osmosis y puedan sufrir algún tipo de crio-alteración por inicio de enucleación esporádica de cuerpos de hielo y en consecuencia el crecimiento de cristales de hielo (Fadda and Cincotti, 2012).

Las investigaciones que han evaluado los resultados entre ambos métodos sobre la viabilidad en TOC son limitadas, mientras que para cada método los autores presentan conclusiones diametralmente opuestas (Rahimi *et al.*, 2009; Silber *et al.*, 2010). Por ejemplo, Gandolfi *et al.*, (2006) reportaron que para el TOC humano y bovino, la CL fue el

método de elección para la crioconservación de este tipo de células en comparación con la VT, que resulto ser menos eficiente en la preservación de la morfología normal de folículos primordiales (en humano 41.1% vs 3.1% y en bovino de 46.7% vs 14%) y primarios (en humano 53.7% vs 0% y en bovino de 53.4% vs 29.2%), respectivamente. Además, los autores sugirieron que el TOC bovino es un buen modelo experimental para el desarrollo de mejores protocolos de criopreservación en TOC y con este tipo de procedimientos posteriormente aplicables en humanos.

Sin embargo, Li *et al.* (2007), no encontraron diferencia entre la proporción de folículos primordiales de humano morfológicamente intactos para CL (72.6%) y VT (82.3%; $p>0.05$), pero si hubo diferencia al compararlos con su grupo testigo no criopreservado (97.6%; $p<0.001$). Dos semanas después de haber cultivado el TOC previamente criopreservado, no encontraron diferencia, respecto a la morfología normal de folículos primordiales entre métodos (CL 25% y VT 24.3%; $p>0.05$), pero la tasa de folículos primarios si fue mayor en los TOC previamente criopreservados (CL 57.1% y VT 59.1%; $p>0.05$) comparados con el grupo testigo no criopreservado (9.7%; $p<0.001$).

En el 2007 Choi *et al.*, reportaron resultados similares al no encontrar diferencia entre CL y VT luego de determinar el efecto de la criopreservación sobre el TOC de ratones, mediante el conteo del número total de folículos primordiales y en desarrollo luego de haberlos cultivado durante 5 días. Ellos reportaron que para el TOC fresco la tasa de folículos primordiales y de folículos en desarrollo fue de 54.6% y 45.4%, respectivamente. En contraste, para los TOC criopreservados por CL y VT al quinto día de cultivo se reporto un incremento significativo en la proporción de folículos primordiales con un 67.2% y 64.9%, respectivamente; sin embargo, se presentaron bajos porcentajes para los folículos en desarrollo (32.8% y 35.1%) comparado con el TO fresco. Los resultados previos mostraron la eficiencia tanto del método de CL y VT al preservar los estadios primordiales en TOC sin diferencia alguna ($p>0.05$), no así para los estadios de desarrollo más avanzados.

Cabe resaltar, que estas dos técnicas de criopreservación han demostrado su eficiencia tanto en ovocitos maduros como en embriones, sin embargo, ahora se busca sean aplicables con éxito total al TOC de las especies de interés, entre ellas el bovino (Woods *et al.*, 2004). Para lograr este cometido es indispensable seguir con el desarrollo de más investigación, necesaria para dilucidar los diferentes parámetros que demandan los tipos celulares ahí incluidos (Woods and Wells, 2013), según el método utilizado, tipo de crioprotector, aumento o reducción en la cantidad de crioprotector, velocidad de enfriamiento o dispositivo de almacenamiento, tal como se muestra en los siguientes reportes para cada método.

Con el objetivo de desarrollar una técnica eficiente para criopreservar folículos de TOC en ovinos mediante el método de CL, Tsuribe *et al.* (2009), analizaron los efectos del etilenglicol (EG) 1.5 M y EG+DMSO 1.5 M como agentes crioprotectores sobre las alteraciones morfológicas foliculares y su respectiva viabilidad. Al realizar el análisis histológico de los fragmentos de corteza encontraron que el porcentaje de folículos preantrales con morfología normal y degenerados en el TOC fresco (72 y 28%), en el TOC sometido a prueba de toxicidad en EG 1.5 M (64 y 36%), EG+DMSO 1.5 M (48 y 52%), y en el TOC criopreservado en EG 1.5 M (44 y 56%) y EG+DMSO 1.5 M (33 y 67%);

respectivamente), fueron estadísticamente diferentes. Las principales alteraciones de tipo degenerativo que se visualizaron en los folículos fue la presencia de núcleos picnóticos tanto del ovocito como de las células de la granulosa. Mientras, que las alteraciones secundarias observadas fueron retracción de los núcleos picnóticos y desprendimiento de la membrana basal de las células de la granulosa. Respecto al porcentaje de folículos primordiales viables en TOC fresco (78.9%), en el TOC después de evaluar la toxicidad en EG 1.5 M (77%) ó EG+DMSO 1.5 M (62%); y el TOC criopreservado en EG 1.5 M (75%) y EG+DMSO 1.5 M (55.6%), se determinó que el EG 1.5 M como único agente crioprotector para la criopreservación de TOC en esta especie fue el mejor en preservar la viabilidad.

En el 2009 Borges *et al.*, determinaron que en folículos preantrales de cerda, criopreservados por el método de CL, utilizando etilenglicol y dimetil sulfóxido, como crioprotectores, se causaron menos alteraciones morfológicas que con propanodiol (<18% vs 44%), respectivamente. Luego de evaluar el resultado del corto efecto de incubación del TOC (2 horas) previamente criopreservado o no, sobre el crecimiento de folículos morfológicamente normales, no encontraron cambios significativos ($p>0.05$), y respecto a las principales alteraciones encontradas en los folículos degenerados, estas fueron picnosis del núcleo del ovocito, crenación del ovocito, vacuolización del citoplasma del ovocito y células de la granulosa desorganizadas.

En ese mismo año, Luz *et al.*, (2009), evaluaron la concentración de perfusión del dimetil sulfóxido (DMSO), el porcentaje de folículos morfológicamente normales y su viabilidad en TOC de cabras, respecto al tiempo de exposición (10, 20, 30 y 40 min) y concentración molar del crioprotector (1.0, 1.5 y 2.0 M). Los reportes finales indicaron que la exposición folicular a DMSO no mostró una reducción significativa ($p>0.05$) del porcentaje de folículos normales en estadio primordial cuando se compararon con el grupo control de folículos no tratados y entre tratamientos. Sin embargo, la exposición en DMSO 2.0 M por 30 y 40 min, si redujo significativamente el porcentaje de folículos normales (60% y 55%, respectivamente) al compararse con el grupo control (86%). Respecto a la concentración de DMSO en el TOC y los niveles hallados, no fueron estadísticamente diferentes respecto al incremento en el tiempo de exposición o por la concentración del crioprotector, excepto para los expuestos en DMSO 1.5 M por 40 min y en DMSO 2.0 M por 30 min, estos resultados fueron confirmados por la baja correlación entre la morfología folicular, concentración de crioprotector y tiempo de exposición ($r^2 = -0.36$). Es importante destacar que los niveles mínimos (0.63 mg) y máximos (1.63 mg) de DMSO se observaron después de exponer los TOC en DMSO 1.0 M por 10 min y en DMSO 2.0 M por 30 min. Seguido a ello, también se observó que el porcentaje de viabilidad de folículos primordiales luego de exponerlos a DMSO 1.0 y 1.5 M por 10 min, no redujo significativamente ($p>0.05$) respecto al control. De acuerdo a los resultados en este experimento, la morfología folicular no se vio afectada de forma negativa respecto al control (85%), cuando los TOC se expusieron en DMSO 1.0 M ó 1.5 M hasta por 40 min (75%), ó en DMSO 2.0 M por 10 (72%) y 20 (66%) min. Sin embargo, la sobrevivencia folicular después de la criopreservación fue similar entre los valores del grupo control (88%) y los TOC expuestos a 1.0 ó 1.5 M de DMSO por un periodo máximo de 10 min (66%).

En previos experimentos también se demostró que el TOC de mamíferos (cabras y ovejas) puede ser eficientemente criopreservado en bajas concentraciones de DMSO, como son 1.5 M (Rodrigues *et al.*, 2004; Fauque *et al.*, 2007) y 2.0 M (Demirci *et al.*, 2001).

Otra sustancia permeable y utilizada como crioprotector en los protocolos de preservación de TOC es el glicerol (GLI), que al igual que el EG, DMSO ó propanodiol se ha sugerido sea utilizada en baja concentración molar, en rango de 1.5 a 3.0 M. Debido a que su efecto crioprotector, también puede causar toxicidad celular, principalmente durante el periodo de exposición (Santos *et al.*, 2007). Por consiguiente, Celestino *et al.* (2008), evaluaron el efecto de dos protocolos de enfriamiento del TOC en solución de NaCl al 0.9 % (protocolo 1: 20°C por 1 hora y protocolo 2: 4°C por 24 h) previo a la exposición ó criopreservación de folículos preantrales bovinos presentes en TOC utilizando GLI como agente crioprotector en dos concentraciones (1.5 y 3.0 M). Como resultado, observaron que los porcentajes (viable/total) de folículos preantrales viables en el TOC control (75%) comparado con fragmentos de TOC (protocolo 1 y 2) que fueron expuestos o criopreservados en GLI 1.5 M (34, 42, 45 y 49 %, respectivamente) y los del protocolo 1 y 2 expuestos o criopreservados en GLI 3.0 M (23, 34, 44 y 37 %, respectivamente) fueron estadísticamente diferentes. Finalmente se concluyó que cuando el TOC se mantuvo a 4 °C (protocolo 2) previo a su criopreservación utilizando GLI 1.5 M, se preservó significativamente la viabilidad de los folículos preantrales (49%) comparado cuando se utilizó una mayor concentración de crioprotector (3.0 M, 37%; $p < 0.05$).

Por otra parte, también se ha evaluado la eficiencia del método de criopreservación mediante las técnicas de vitrificación y las soluciones para preservar la morfología y viabilidad de folículos preantrales incluidos en TOC. Carvalho *et al.* (2011), mediante vitrificación convencional evaluaron la eficiencia de almacenar TOC de caprino, en pajillas francesas (VPF), macrotubos (VMT) y en superficies sólidas (VSS); así como el efecto de adicionar o no, sucrosa (0.25 y 0.5 M), 10% de suero fetal bovino (SFB) ó ambos elementos a las soluciones de vitrificación. Al evaluar los resultados, se observó que en cada uno de los protocolos utilizados (almacenamiento y soluciones) se redujo significativamente el porcentaje de folículos morfológicamente normales relativos al grupo control (88.0%) no criopreservado; sin embargo, la adición de sucrosa 0.25 M y 10% de SFB en la solución de vitrificación mejoró la preservación de la morfología folicular (67.4, 67.4 y 72.0% para VPF, VMT y VSS, respectivamente). Aunque la viabilidad folicular al utilizar el método VSS (80.7%) no fue diferente del TOC control (88.0%), después del cultivo *in vitro* (24h), los porcentajes de folículos viables sí se redujeron notablemente (70.0%) respecto al control fresco. Los porcentajes de folículos morfológicamente normales después del corto cultivo *in vitro* de TOC vitrificado fueron similares (76.0%) con aquellos fragmentos de TOC cultivados sin previa vitrificación (83.2%). Finalmente concluyeron que en el método VSS usando soluciones que contengan sucrosa 0.25 M y 10% de SFB, resultaron ser las más eficientes para vitrificar TOC caprino.

Usualmente la aplicación de ciertas modificaciones dentro del método de vitrificación convencional (CV) han sido necesarias para mejorar los resultados de esta técnica, dentro de esas modificaciones al método, se cita la novedosa vitrificación directa en funda (DCV) desarrollada previamente por Chen *et al.* (2006), basada en utilizar una menor concentración de agentes crioprotectores y la aplicación directa del nitrógeno líquido al

TOC. Ellos reportaron que la aplicación de dicho método fue altamente eficiente, y permitió obtener una elevada sobrevivencia folicular en TOC de ratón. Años más tarde, Zhou *et al.* (2010), compararon el efecto de los métodos DCV y CV sobre la integridad de TOC humano, con tres diferentes concentraciones de crioprotectores (5, 7.5 y 10% en soluciones de equilibrio y 10, 15 y 20% en soluciones de vitrificación, respectivamente) para la DCV (1, 2 y 3, respectivamente) y así determinar el método más óptimo a utilizar. Al analizar los resultados, determinaron que el porcentaje de la morfología normal en los diversos estadios de desarrollo folicular para el TOC fresco (95%; control) fue mayor al de los demás tratamientos de DVC1 (55.7%), DCV2 (76.7%), DCV3 (64.6%) y CV (61.0%). El grupo DCV2 fue quien presentó mejores resultados entre los tratamientos, mientras que el porcentaje de folículos primordiales y primarios (53 por muestra), con ultra estructura normal luego de la vitrificación, fueron diferentes (58.3, 75, 66.7 y 50%, respectivamente), comparados con el grupo control (100%). No obstante, demostraron que entre los TOC humanos vitrificados, en los del grupo DVC2 se produjeron menos daños y con ello una densidad y viabilidad folicular mayor. Finalmente se concluyó que este novedoso método de vitrificación con la óptima concentración de crioprotectores fue superior al convencional. Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con reportes sobre el uso y eficiencia de los métodos de DCV y CV para TOC bovino.

1.1.4 Reanudación de la foliculogénesis

La ovogénesis y la foliculogénesis envuelven un mecanismo complejo de interacciones endócrinas, parácrinas y autócrinas entre el ovocito y las células somáticas del folículo, que se desarrollan en los ovarios de los mamíferos (Gilchrist, 2011). Los folículos ováricos se pueden clasificar en folículos preantrales y antrales (Martins *et al.*, 2008; Aerts y Bols, 2010). Dentro de los folículos preantrales se incluyen los folículos primordiales, primarios y secundarios, los cuales no dependen completamente de gonadotrofinas (LH y FSH) para su desarrollo, ya que su crecimiento es estimulado por factores intra-ováricos y locales. A diferencia, los folículos antrales que comprenden a los folículos terciarios y a los pre-ovulatorios o folículos de *De Graaf*, que dependen en su totalidad de las gonadotrofinas para su desarrollo y mantención (Magalhães *et al.*, 2012 a).

Las células germinales primordiales dentro de las gónadas en desarrollo inician su diferenciación en ovogonias y proliferan por mitosis para formar los folículos primordiales durante la vida fetal. La primera profase meiótica inicia entre los días 75 y 82 de desarrollo fetal bovino, durante la gestación (Diniz *et al.*, 2005). Durante el estadio de diploteno de la meiosis 1, aproximadamente entre los días 90 y 180 de la gestación, se forman los primeros folículos primordiales y los ovocitos de esos folículos permanecen quiescentes hasta ser estimulados para su crecimiento. En este momento, los folículos primordiales presentan un diámetro cercano a los 40 μm y consisten del ovocito esférico u ovoide detenido en la profase 1 de la primera meiosis, sin zona pelúcida y completamente rodeado por una única capa de células de la granulosa aplanadas, éstos folículos constituyen la reserva ovárica y pueden permanecer de modo indefinido en los ovarios, con posterior activación para su desarrollo, hasta este momento el folículo no es gonadotropo-dependiente (Lima-Verde *et al.*, 2011).

Los folículos primordiales, primarios y secundarios aparecen en el ovario fetal durante los días 90, 140 y 210 de la gestación, respectivamente (Araújo *et al.*, 2010), mientras que la activación del crecimiento folicular se caracteriza por la adquisición de una capa completa de 11 a 20 células cuboidales de la granulosa alrededor del ovocito, formando así el folículo primario. Esos folículos primarios tienen un diámetro cercano a 100 μm y se caracterizan por la presencia de un ovocito esférico (40 μm), con capa única de células cuboidales de la granulosa e inicio de la formación de la zona pelúcida (Lima-Verde *et al.*, 2011). Los folículos secundarios poseen diámetro cercano a los 200 μm y dos o más capas de células cuboidales de la granulosa, que se caracterizan por la formación de gránulos corticales en el interior del citoplasma del ovocito, por el inicio de la síntesis de RNA y por la respuesta a las gonadotropinas FSH y LH (Fair, 2003). Con el crecimiento de los folículos secundarios y la organización de las células de la granulosa cuboidales en varias capas, se da paso a la formación de una cavidad llena de líquido denominada antro (Saraiva *et al.*, 2010). A partir de éste estadio, los folículos pasan a denominarse terciarios, con un diámetro cercano a 400 μm , caracterizados por el desarrollo de las capas de la teca interna y externa, la lamina basal y las células del cumulus. Finalmente, los folículos pre-ovulatorios son aquellos que presentan una cavidad de mayor volumen, próximos a la ovulación y se conocen también como folículos antrales maduros o de *De Graaf* (Barnett *et al.*, 2006; Leitão *et al.*, 2009).

La cantidad de folículos primordiales en los ovarios de las hembras bovinas varía de acuerdo a la etapa de desarrollo. Se ha determinado que su número oscila de 16,000 a 2,700,000 durante los días 50 a 110 del desarrollo fetal, número que tiende a disminuir después del nacimiento (Hyttel *et al.*, 2010). La transición del estadio de folículo primordial hacia los estadios de mayor desarrollo es gradual y son procesos que se acompañan por la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, que crecen y morfológicamente pasan de ser planas a cuboidales (Aerts y Bols, 2010).

El efecto de las gonadotropinas sobre el desarrollo folicular preantral aún es controversial, pues se sabe que el crecimiento de los folículos antrales inicia luego de alcanzar un diámetro cercano a los 4 mm en ausencia de FSH, lo que sugiere que el desarrollo folicular preantral es básicamente regulado por factores intraováricos y locales (Buratini Jr., 2007). Sin embargo, se han detectado receptores para FSH en folículos primarios y secundarios de bovinos (Martins *et al.*, 2008), así como en la estimulación del desarrollo folicular preantral, por medio del aumento del diámetro folicular y de la secreción de estradiol que se alcanza al adicionar FSH al medio de cultivo, lo que sugiere que la FSH podría desempeñar un papel regulador en este estadio de desarrollo (Saraiva *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011).

El proceso que controla la activación del folículo primordial no se conoce con exactitud, no obstante, ciertos investigadores sugieren que dentro de ese proceso, la FSH podría estar implicada en la activación de los folículos primordiales (Silva *et al.*, 2004). Debido a que los receptores para FSH en estos folículos se han restringido principalmente a las células de la granulosa, y se considera como hipótesis que estas células podrían participar en la regulación del crecimiento del ovocito por medio de un estímulo que induzca la producción de factores de crecimiento locales (Martins *et al.*, 2008).

Respecto al desempeño del ovocito durante el proceso de formación folicular, se ha relacionado con la producción de factores de transcripción tipo α , presentes en células de linaje germinativo, llamados $FIG\alpha$, y expresados por los ovocitos (Buratini Jr., 2007).

Las comunicaciones intercelulares son procesos citoplásmicos trans zonales, en el caso de las células de la granulosa, estas penetran a través de la zona pelúcida hasta llegar a la membrana del ovocito, donde forman uniones del tipo *gap* que permiten el transporte bi direccional de iones, metabolitos, aminoácidos, azúcares, nucleótidos y pequeñas moléculas que regulan el crecimiento del ovocito, sea como moduladores de la acción de transcripción o inducción de modificaciones de diversas proteínas en el ovocito (Araújo *et al.*, 2010; Saraiva *et al.*, 2010). Este tipo de comunicaciones entre el ovocito y las células de la granulosa es regulado durante el desarrollo pre antral, ya que esos procesos citoplásmicos se retraen al momento en que el folículo alcanza el estadio de desarrollo antral, lo cual puede ser un efecto de acción de la FSH (Buratini Jr., 2007; Aerts y Bols, 2010). Así, la comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa es mediante señalizaciones del tipo parácrina (Buratini Jr., 2006). Entre los diversos factores de crecimiento que se producen por ambos tipos celulares se encuentran el factor de células tronco (SCF, conocido como *kit*-ligando), ciertos miembros de la familia de factores de crecimiento transformantes- β (TGF- β), principalmente el factor de crecimiento diferencial 9 (GDF-9) y la proteína morfogénica de hueso-15 (BMP-15), que en conjunto con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) han sido de los más estudiados (Leitão *et al.*, 2009; Saraiva *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011).

En un estudio realizado por Martins *et al.* (2008), demostraron que la activación del folículo primordial requiere la presencia de una molécula llamada *kit*-ligando, que es secretada por las células de la granulosa de los folículos primordiales y primarios en los rumiantes. Los receptores para el *kit*-ligando se conocen como *C-kit*, y son expresados por los ovocitos de folículos en crecimiento, por las células del estroma y por las células de la teca diferenciadas (Leitão *et al.*, 2009). El *kit*-ligando desempeña una función quimiotáctica durante la migración de las células germinales primordiales hacia la gónada en desarrollo, además estimula la síntesis de ADN por parte de las células de la granulosa por medio de la secreción de sustancias miogénicas ovocitarias responsables de dar inicio a la proliferación de dichas células (Otsuka y Shimasaki, 2002; Aerts y Bols, 2010). El *kit*-ligando también ejerce cierto efecto anti-apoptótico en las células germinales primordiales, en las ovogonias, en los ovocitos y en los folículos preantrales y controla el crecimiento del ovocito y la diferenciación de las células del estroma en las células de la teca (Buratini Jr., 2007). Efectos similares se le han observado al factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF-2), que es producido por ovocitos de los folículos primordiales y primarios y en células de la granulosa y de la teca de folículos preantrales en crecimiento, que igualmente induce activación del folículo primordial y promueve la diferenciación de las células del estroma en células de la granulosa (Aerts y Bols, 2010).

Otros factores de crecimiento como los de tipo insulinoide (IGF), regulan el crecimiento folicular preantral por medio de mecanismos endócrinos al estimular el desarrollo de las células de la granulosa por medio de la multiplicación de esas células y el crecimiento del ovocito (Magalhães *et al.*, 2012 a). Los factores IGF-1 e IGF-2 no se expresan en los folículos preantrales, sin embargo, esos folículos si presentan receptores para IGF-1 y

proteínas ligando para IGFBP-2 e IGFBP-3, que son sustancias reguladoras de la biodisponibilidad de factores de crecimiento extra ováricos como el IGF-1 de tipo hepático (Aerts y Bols, 2010; Oliveira *et al.*, 2011), lo cual señala la importancia de los factores de crecimiento tipo insulinoide para esos estadios de desarrollo folicular inicial.

Silva *et al.* (2002) y Martins *et al.* (2008) mencionan otras sustancias relevantes en la señalización parácrina preantral, en las cuales se cita la activina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). La activina tiene la capacidad de estimular la activación de receptores para FSH en los folículos preantrales en bovinos, lo que resulta en el crecimiento de esos folículos, aumento en el número de células de la granulosa y promueve la mantención de la viabilidad folicular. El EGF tiene la capacidad de promover la proliferación de las células de la granulosa, mediante el aumento del diámetro de los folículos preantrales, así como la reducción de los niveles de atresia en folículos bovinos preantrales cultivados *in vitro* (Celestino *et al.*, 2012). El KGF lo producen las células de la teca en folículos antrales, y a su vez influencia el crecimiento de las células de la granulosa y la transición de los folículos adyacentes del estadio primordial a primarios. Por último, el VIP promueve la regulación de la esteroidogénesis, estimula la maduración ovocitaria y favorece la sobrevivencia de las células de la granulosa al inhibir la apoptosis (Martins *et al.*, 2008).

1.1.5 Cultivo *in vitro* celular

El nuevo enfoque de investigación en reproducción asistida se dirige a la criopreservación de folículos preantrales, debido a que las características de los ovocitos preantrales incluidos en el TOC los sitúan como mejores prospectos para el proceso de criopreservación que aquellos ovocitos maduros que no están presentes en el TOC (Yeoman *et al.*, 2005). La criopreservación de TOC se ha aplicado a nivel mundial, principalmente en humanos por razones terapéuticas, sin embargo, diversos estudios han evaluado el éxito de los procedimientos de criopreservación de TOC por desarrollo de folículos *in vitro* en cortos periodos, valorando únicamente características morfológicas e histológicas (Gandolfi *et al.*, 2006; Celestino *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2010). El uso de estas técnicas histológicas podría ser insuficiente para evaluar los efectos criobiológicos sobre TOC, ya que con frecuencia no se correlacionan la viabilidad y competencia de desarrollo de los folículos con sus efectos a nivel ultraestructural (Celestino *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2007), además es necesario se validen en medios de cultivo *in vitro* la sobrevivencia de ovocitos procedentes de TOC, previamente criopreservado (Faheem *et al.*, 2011).

Se sabe que el medio de cultivo cumple un papel fundamental para el desarrollo y mantenimiento de ovocitos antes y después de ser fertilizados, y posteriormente el desarrollo y viabilidad embrionaria hasta que sean transferidos o criopreservados como su último proceso en el laboratorio (De los Reyes *et al.*, 2003).

Sin embargo, los medios de cultivo varían en sus componentes esenciales, los cuales se han establecido para cierto tipo de células o tejidos específicos. Debido a que no se conoce con exactitud los requerimientos específicos de los folículos preantrales en cultivo o del

TOC en la especie bovina, es necesario suplementar éstos medios con elementos que en previas investigaciones han proporcionado resultados favorables (Passos *et al.*, 2013). Diversos estudios han reportado los efectos de suplementar éste tipo de medios sobre la activación y desarrollo de folículos *in vitro* en diversas especies, observando mejores resultados respecto a los grupos control (Magalhães *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2012 **b**; Magalhães-Padilha *et al.*, 2012). Los componentes principales que se adicionan a los medios de cultivo son insulina, transferrina, selenito sódico (ITS), piruvato, glutamina, ácido ascórbico, suero fetal bovino (FBS), hormona folículo estimulante (FSH) y antibióticos como la penicilina G y sulfato de estreptomicina indispensables en el metabolismo celular y hormonal, así como para reducir los problemas por contaminación bacteriana (Andrade *et al.*, 2005; Gigli *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2011; Haag *et al.*, 2013).

Otro aspecto notorio durante el cultivo de folículos aislados o TOC, se haya o no criopreservado previamente, es que de acuerdo al periodo de tiempo que se mantenga en cultivo, se han de observar variaciones en cuanto a la viabilidad y morfología sobre el número total de folículos presentes en sus diversos estadios de desarrollo (Carvalho *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2012; Passos *et al.*, 2013).

Por tanto, evaluar los efectos y la dinámica del medio de cultivo enriquecido con elementos que favorezcan el mantenimiento metabólico celular *in vitro*, de folículos preantrales aislados de TOC bovino luego de su descongelación/calentamiento, son necesarios.

1.2 JUSTIFICACIÓN GENERAL

El éxito en la preservación y almacenamiento de TOC bovino a bajas temperaturas (-196 °C) ofrece la posibilidad de preservar la viabilidad e integridad de los folículos preantrales presentes y con ello la fertilidad de las hembras.

El progreso en la adecuada preservación de estos recursos biológicos puede permitir una mayor eficiencia del manejo en ganado y especies de laboratorio, además de mejorar la conservación de la biodiversidad, incluyendo especies en peligro de extinción, lo que conllevaría a una disponibilidad inmediata de un mayor número de ovocitos provenientes de folículos preantrales.

Sin embargo, la información que se tiene de los efectos de: el proceso aséptico posterior a la colección de ovarios sobre la integridad folicular preantral de la corteza; las técnicas de curva lenta y vitrificación en la sobrevivencia e integridad de los folículos preantrales de la corteza ovárica luego de revertir el proceso de criopreservación; y del proceso de cultivo *in vitro* de folículos preantrales procedentes de corteza ovárica criopreservada o no, en la especie bovina es limitada y con ello las conclusiones son variadas.

Por lo tanto, resulta importante determinar la eficiencia de: el proceso aséptico sobre la integridad folicular preantral; las técnicas de criopreservación sobre la viabilidad e integridad de los folículos preantrales posterior a dichos procesos criogénicos; el cultivo *in vitro* sobre la integridad de los folículos preantrales, todos ellos provenientes de la corteza ovárica bovina.

1.3 HIPÓTESIS

H1

El proceso aséptico durante la colecta de ovarios en rastro afecta la integridad folicular preantral de la corteza en bovinos.

H2

En el proceso de criopreservación se estima que el método de vitrificación es más eficiente que el método de curva lenta para preservar la viabilidad e integridad de los folículos preantrales presentes en el tejido ovárico cortical de hembras bovinas.

H3

Durante el periodo de cultivo *in vitro* de los folículos preantrales provenientes de tejido ovárico cortical bovino pos-criopreservado y no criopreservado se espera que la viabilidad, e integridad sean similares.

1.4 OBJETIVO GENERAL

Determinar en los folículos preantrales provenientes de solapas de corteza ovárica bovina los efectos de: a) la asepsia de ovarios en rastro; b) los métodos de criopreservación de curva lenta y vitrificación; y c) el cultivo *in vitro* en la sobrevivencia e integridad.

1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar como se afecta la integridad folículo preantral de la corteza ovárica bovina por el proceso aséptico durante la colecta en rastro.

Evaluar y comparar la eficiencia de los métodos de vitrificación y de curva lenta sobre la integridad y viabilidad de folículos bovinos preantrales presentes en tejido ovárico cortical pos-descongelación.

Aislamiento de folículos preantrales viables de la corteza ovárica mediante raspado mecánico y disgregación enzimática.

Cultivar *in vitro* los folículos bovinos preantrales provenientes de tejido ovárico cortical descongelado/calentado y evaluar su sobrevivencia.

2.0 CAPITULO 2

Ultraestructura de folículos preantrales bovinos: Efecto del proceso aséptico en rastro sobre la integridad folicular.

Ultrastructure of bovine preantral follicles: Effect of the slaughterhouse aseptic process on follicular integrity.

Ultrastructure of bovine preantral follicles: effect of the slaughterhouse aseptic process on follicular integrity

Jadiel Leonel Cisneros Prado^{1,2}

0000-0003-0815-0866

Felipe Montiel Palacios²

0000-0002-4708-6054

Rodolfo Canseco Sedano²

0000-0001-6547-6681

Horacio Merchant Larios³

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana (UV), Veracruz, Veracruz, México.

³ Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, México.

*Corresponding author:

Tel: + 52 55 56 16 25 68; 55 56 22 38 33

Email address:

merchant@unam.mx

Abstract

Ovaries from slaughtered cows are the most abundant source of preantral immature follicles for *in vitro* studies including maturation and *in vitro* fertilization. Integrity of immature follicles may be compromised by inadequate management during the collection and transport of the gonads, limiting the success of a correct evaluation. This study assessed the effect of aseptic and transport of bovine ovaries on the structural and ultrastructural integrity of immature follicles from the ovarian cortex. Ovaries from 20 different crossbred cows (*Bos taurus* × *B. indicus*) were randomly assigned to one of two aseptic and transport treatments: (1) the ovaries were washed once with 70 % ethanol for 10 s, rinsed twice with normal saline solution (OH + NSS), and then transported in NSS + 0.05 % gentamicin sulphate; or (2) the ovaries were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and transported in PBS + 0.05 % gentamicin sulphate. Samples of the ovarian cortex were obtained from each treatment group. Half of samples of each treatment was processed for histologic evaluation of follicular morphology and developmental stage using haematoxylin & eosin, and the other half was processed to analyse the ultrastructure of immature follicles using transmission electronic microscopy. The rates of good-quality follicles were 36.95 % and 88.6 % for OH + NSS and PBS, respectively. Histological analysis showed higher number of abnormal follicles in OH + NSS than in PBS treated ovaries ($F_{1,12} = 99.64$, $P = 0.0001$). The proportions of morphological alterations were not significantly different between treatments ($\chi^2_{1,7} = 7.72$, $P = 0.358$). The ultrastructure of immature follicles from OH + NSS ovaries showed cell damage, revealed by abundant cell detritus around both, the oocyte and follicular cells. However, the presence of alterations was barely evident in both the cytoplasm and the nucleus of the granulosa cells.

Keywords: aseptic process, ovarian tissue, immature follicles, cattle.

Received: 2016-11-04

Accepted: 2017-04-18

Published: 2017-05-05

Additional information and declarations can be found on page 10

© Copyright 2017
Jadiel Leonel Cisneros Prado et al.

open access 



Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Cite this as:

Cisneros Prado JL, Montiel Palacios F, Canseco Sedano R, Merchant Larios H.

Ultrastructure of bovine preantral follicles: effect of the slaughterhouse aseptic process on follicular integrity. *Veterinaria México OA*. 2017;4(2). doi: [10.21753/vmoa.4.2.424](https://doi.org/10.21753/vmoa.4.2.424).

Introduction

The preantral ovarian follicle is a defined developmental unit consisting of a single oocyte surrounded by layers of somatic granulosa cells enveloped by a basal membrane. During postnatal life, most oocytes are as quiescent primordial follicles within a single layer of a few "flat" squamous, nonproliferating granulosa cells.¹ Upon growth activation, the granulosa cells switch to a cuboidal morphology and begin to proliferate while the oocyte initiates the growth phase (primary follicles). Follicle development consists of continued proliferation and differentiation of the granulosa layers, acquisition of an additional cell layer outside the basement membrane (termed the theca), and continued oocyte growth (secondary or preantral follicle).² In the past decade, great emphasis has been placed on the population of preantral immature follicles present in the ovarian cortex, which constitutes an abundant reserve and represents an alternative for the development of cell cultures,³ *in situ* transplants⁴ and cryopreservation,^{5,6} in addition to preserving steroidogenic functions of the ovarian cortex.⁷ During ovary collection from cows at the slaughterhouse, the possible effect of the aseptic process on the delicate integrity of preantral immature follicles found at the edge of the ovarian cortex is not usually considered. Various studies assumed that the drastic reduction in the number of bacteria in the ovaries achieved with 70 % ethanol during ovary collection is sufficient to obtain ideal ovarian tissue samples for culture or cryopreservation.^{8,9,10} However, ethanol has the ability to trigger oxidative stress at the cytoplasmic membrane in liver and kidney tissue.¹¹ Such stress results from the inability of the antioxidant defenses to combine with the oxygen reactive species through the electron transport chain in the mitochondria, and though this alcohol toxicity-mediated mechanism is complex, it promotes the transition of the mitochondrial permeability, leading to apoptosis.^{11,12,13}

Replication of the aseptic and transport procedures for ovaries used by several researchers^{8,9,14-17} showed great variations in the integrity of preantral immature follicles, including non-treated follicles. It remains unclear whether the observed variations could be associated with the aseptic process of ovarian collection and transport to the laboratory. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the aseptic process after the collection and transport of bovine ovaries on the structural and ultrastructural integrity of preantral immature follicles from the ovarian cortex.

Material and methods

Samples preparation

Ovaries (n = 20) from crossbred female cattle (*Bos taurus* × *B. indicus*; 3-5 years old) were collected immediately after slaughter at a local abattoir. Ovaries were assigned to one of the following treatments: (1) the ovaries (n = 10) were washed once with 70 % ethanol for 10 s (J.T. Baker®, MEX), rinsed twice with normal saline solution (OH + NSS; PISA®, MEX), and then placed in a transport medium based on NSS + 0.05 % gentamicin sulphate (Gentalex®Fuerte, PISA, MEX); or (2) the ovaries (n = 10) were washed three times with phosphate buffered saline (PBS; Bioniche®, USA), and transported in a medium containing PBS + 0.05 % gentamicin sulphate.

The ovaries were transported to the laboratory in sealed containers at 4 °C within 1-3 h after collection. At the laboratory, each ovary was immediately placed in

a sterile Petri dish (Falcon® 100 × 15 mm) containing modified human tubal fluid medium (HTF HEPES®; In Vitro Care®; USA), supplemented with foetal bovine serum (FBS; BioWest®; USA). With the aid of dissection tweezers and a scalpel blade (Num. 12), each ovary was divided to obtain six small cortex samples (2 mm × 1 mm × 1 cm). Three samples of cortex from each ovary were fixed in buffered formalin, embedded in paraffin squares, cut at 7 µm and stained with hematoxylin & eosin (H&E) to evaluate the follicular morphology and development stage under a light microscope (B150DB-R, Optika®, Italia). The follicles were classified as primordial (a single layer of flat cells surrounding the oocyte), primary (a single layer of cuboidal granulosa cells), or secondary (two or more layers of cuboidal granulosa cells surrounding the oocyte).¹⁸ Based on their morphology, the follicles were also classified as normal or atretic, according to the presence or absence of pyknotic nucleus, oocyte retraction, and/or disorganization of the granulosa cells and separation from the basal membrane.¹⁹

The remaining three samples of ovarian cortex from each ovary were used to conduct a more detailed evaluation through an ultrastructural analysis of the immature follicles. The tissue fragments were fixed in Karnovsky solution (2 % paraformaldehyde and 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2) for 24 h at 4 °C. After fixation, the tissue fragments were washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer and mechanically isolated with a scalpel due to the non-homogeneous degree of follicular density and distribution in the ovarian tissue, which affects interpretation.^{20,21} Then, the tissue fragments were post-fixed in 1 % osmium tetroxide in Zetterqvist buffer for 1 h. Subsequently, the samples were dehydrated in gradually doses of ethanol (50, 70, 80, 90 and 100 %) for 15 min each one, moved to acetonitrile for 20 min, and then embedded in proportions 1:1, 2:1 of EPON 812 resin:acetonitrile, for 1 h each, and finally in only EPON 812 resin for 24 h. The semi-fine cuts (1-2 µm) were stained with toluidine blue. The fine cuts (60-70 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined by transmission electron microscopy (Jeol JEM 100C).²²

Statistical analysis

The follicles in different development stages with normal morphology in each treatment group were counted and expressed as a percentage ± one standard deviation (SD). Data were analysed by ANOVA and the Tukey's test to determine the differences between treatments. The main morphological abnormalities observed (categorical variables) by light microscopy are presented as a percentage, and the data were analysed using χ^2 to determine the homogeneity of proportions. For all the tests, Statistica v. 10.0 software was used and values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results and discussion

Histological analysis

In total, 626 immature follicles were evaluated. The overall percentages of follicles in the primordial, primary and secondary development stages were 71.4 %, 21.0 %, and 8.6 %, respectively.

and 7.6 %, respectively. The percentage of high quality follicles (classified as normal follicles) obtained from the PBS and OH + NSS treated groups, was 88.6 % and 36.9 %, respectively. The histological results between the PBS and OH + NSS treatments showed differences in the number of normal follicles in the evaluated samples of ovarian cortex (Figure 1), with a higher number and quality in those treated with PBS ($F_{1,12} = 99.64$, $P = 0.0001$). Statistical analysis also showed differences between development stages within each of the treatments groups ($F_{2,12} = 262.67$, $P = 0.0001$; Table 1). Light microscopy was used to evaluate atretic abnormalities in the ovarian tissue samples from each treatment group, and the proportion of alterations to immature follicles was not different between the two treatments ($\chi^2_{1,7} = 7.72$, $P = 0.358$; Table 2).

Ultrastructural analysis

The semi-fine cuts stained with toluidine blue revealed diverse structural alterations among the follicles of each treatment group (10 follicles for treatment; Figure 2). Ultrastructural evaluation confirmed that the oocytes from immature follicles present in the samples of the ovarian cortex treated with OH + NSS were completely damaged, as only detritus and a high number of vesicles in the space that corresponds to the immature follicle was observed (Figures 3A-3E). However, at least 64 % of granulosa cells within the ten analysed follicles retained their integrity (Figures 3E-3F). This result suggests that granulosa cells may have unique characteristics rendering them more resistant to the effects of dehydration and oxidative stress induced by the alcohol applied during the asepsis process.

A large amount of lipid droplets surrounded by polysaccharides was present in all the observed granulosa cells (Figures 3D-3F). Likewise, abundant mitochondria with well delimited cristae were evenly distributed throughout the cytoplasm of the granulosa cells (Figures 3D-3F). Other abundant cytoplasmic organelles were the rough and smooth endoplasmic reticulum and the ribosomes. The nuclei of the granulosa cells were pleomorphic and showed abundant heterochromatin and euchromatin, and this level of evaluation did not reveal significant damage. Consequently, the tight union of the granulosa cells membranes was also observed (Figure 3F).

On the other hand, the evaluation of the immature follicles present in the cortex of ovaries treated with PBS confirmed that those follicles were not affected compared with those treated with OH + NSS. The ultrastructure of the immature follicles revealed basal membranes formed by a basal lamina and collagen fibers which provide support and firmness to the follicle within the ovary (Figures 4A and 4B). The nuclei of the granulosa cells of the primary and secondary follicles were mostly pleomorphic and had abundant heterochromatin. The cytoplasmic organelles, such as the mitochondria, Golgi apparatus, smooth and rough endoplasmic reticulum, and lysosomes were distributed throughout the cytoplasm and had a normal appearance. Occasional small vesicles with lipids inside were also found in the cytoplasm (Figure 4A).

In the oocytes from primary and secondary follicles, the Golgi apparatus was well developed and occupied a large part of the cytoplasm. The amount of smooth and rough endoplasmic reticulum was diminished and the presence of lipid droplets was scarce compared to the granulosa cells. The size, shape and ultrastructure

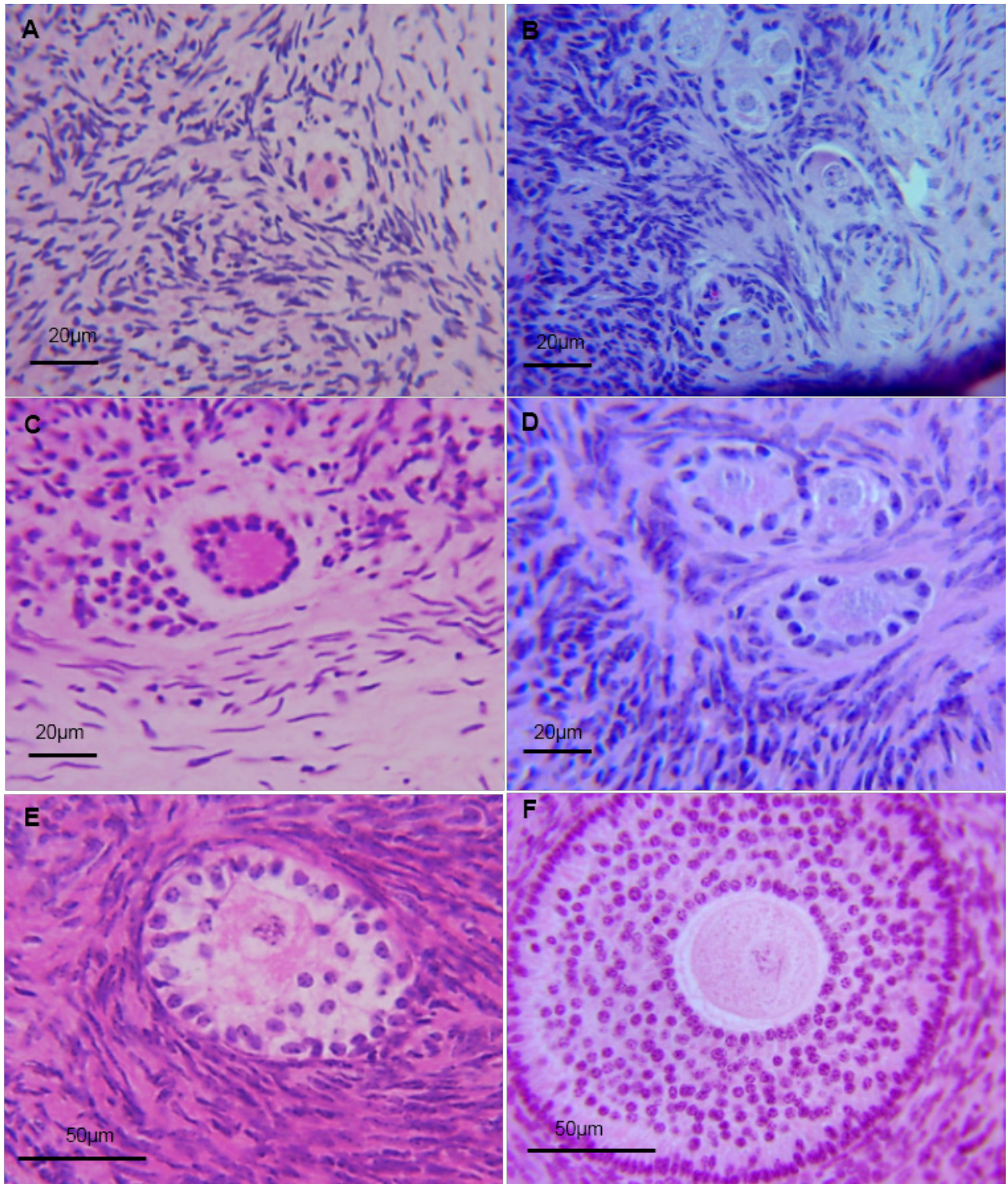


Figure 1. Images A, C, and E were observed in the samples of ovarian tissue corresponding to OH + NSS treatment; images B, D, and F correspond to PBS treatment. Good-quality primordial (A and B, viewed at 40X), primary (C and D, viewed at 40X), and secondary (E and F, viewed at 10X) immature follicles presents in the samples of bovine ovarian cortex.

Table 1. The percentage of normal bovine follicles at each stage of development obtained from ovaries retrieved from a slaughterhouse, using two aseptic methods during collection and transport to the laboratory.

Groups	Treatments during collection and transport of ovaries	
	OH+NSS	PBS*
Primordial	43.6 ± 5.6 ^a (102/234)	90.6 ± 4.5 ^d (193/213)
Primary	12.7 ± 1.2 ^b (8/63)	87.0 ± 4.6 ^e (60/69)
Secondary	36.4 ± 2.1 ^c (8/22)	76.0 ± 1.2 ^f (19/25)

Data are expressed as percentage ± 1 SD. The values in parenthesis are the observed number of follicles with good morphology divided by the total number analysed for each group during histological evaluation.

*Statistically different from those treated with OH+NSS ($F_{1,12} = 99.64$, $P = 0.0001$).

^{a,b,c,d,e,f} Different superscripts indicate significant difference in each stage of follicular development ($F_{2,12} = 262.67$, $P = 0.0001$).

Table 2. Main morphological alterations found in atretic immature follicles in samples of ovarian cortex treated with OH + NSS or PBS during collection.

Morphological alterations	Treatment during collection and transport of the ovary % (number of observations/total)	
	OH + NSS	PBS
Partial crenation	13.9 (28/201)	14.3 (5/35)
Complete crenation	10.4 (21/201)	8.6 (3/35)
Cytoplasmic vacuolation of the oocyte	8.9 (18/201)	2.8 (1/35)
Vacuolation of the follicle	5.5 (11/201)	0
Disorganization of granulosa cells	29.4 (59/201)	48.6 (17/35)
Partial or complete detachment of granulosa cells and oocyte	25.9 (52/201)	22.9 (8/35)
Nuclear pyknosis	4 (8/201)	2.8 (1/35)
Multinucleation	2 (4/201)	0

Data are expressed as percentage of the total of each column for the main alterations found among follicles for each treatment.

The proportions of morphological alterations between treatments did not show significant difference ($\chi^2_{1,7} = 7.72$, $P = 0.3581$).

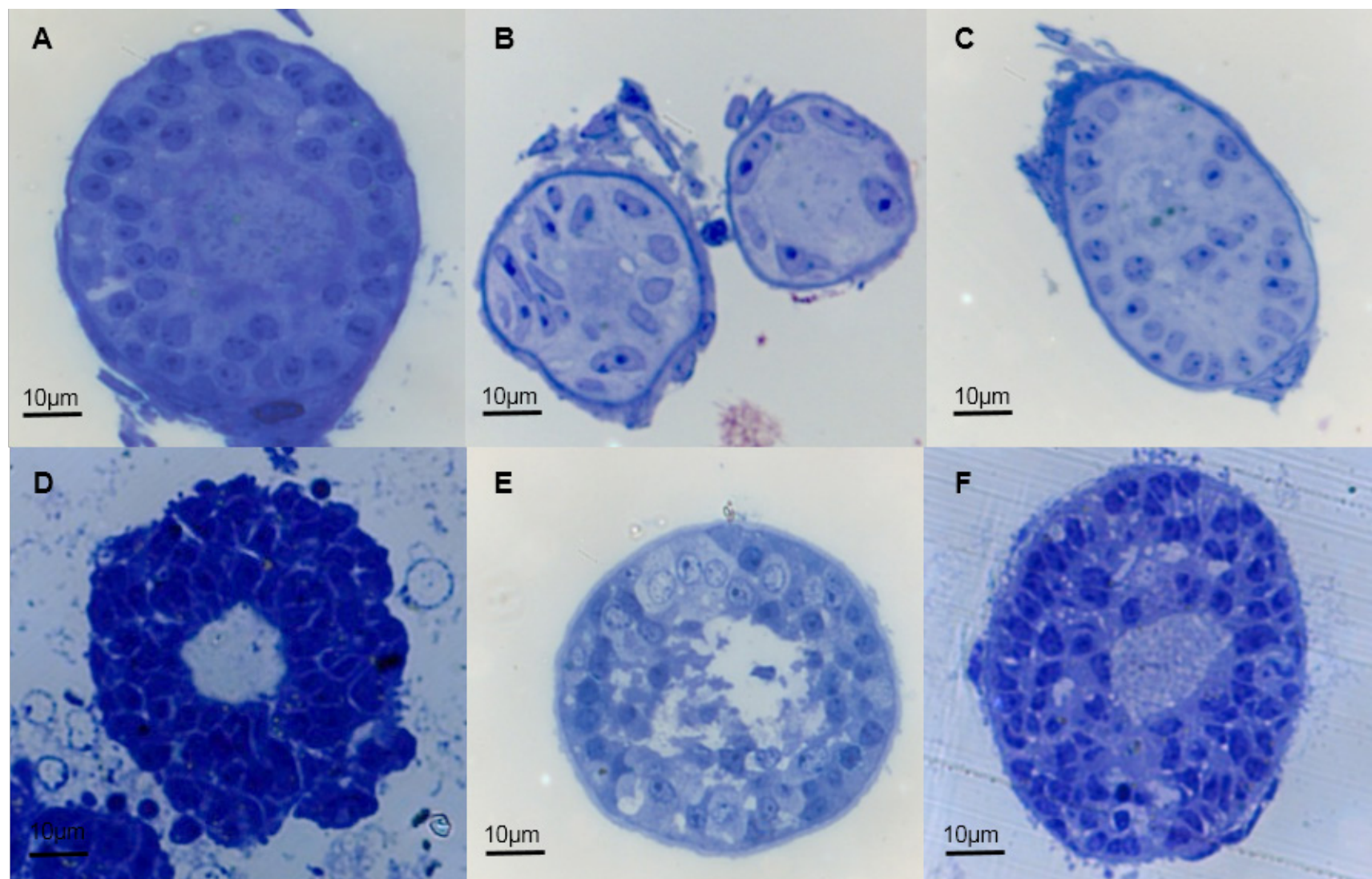


Figure 2. Semi-fine cuts of immature follicles present in bovine ovarian cortex treated with PBS (A, B, C; viewed at 40X) or OH+NSS (D, E, F; viewed at 40X).

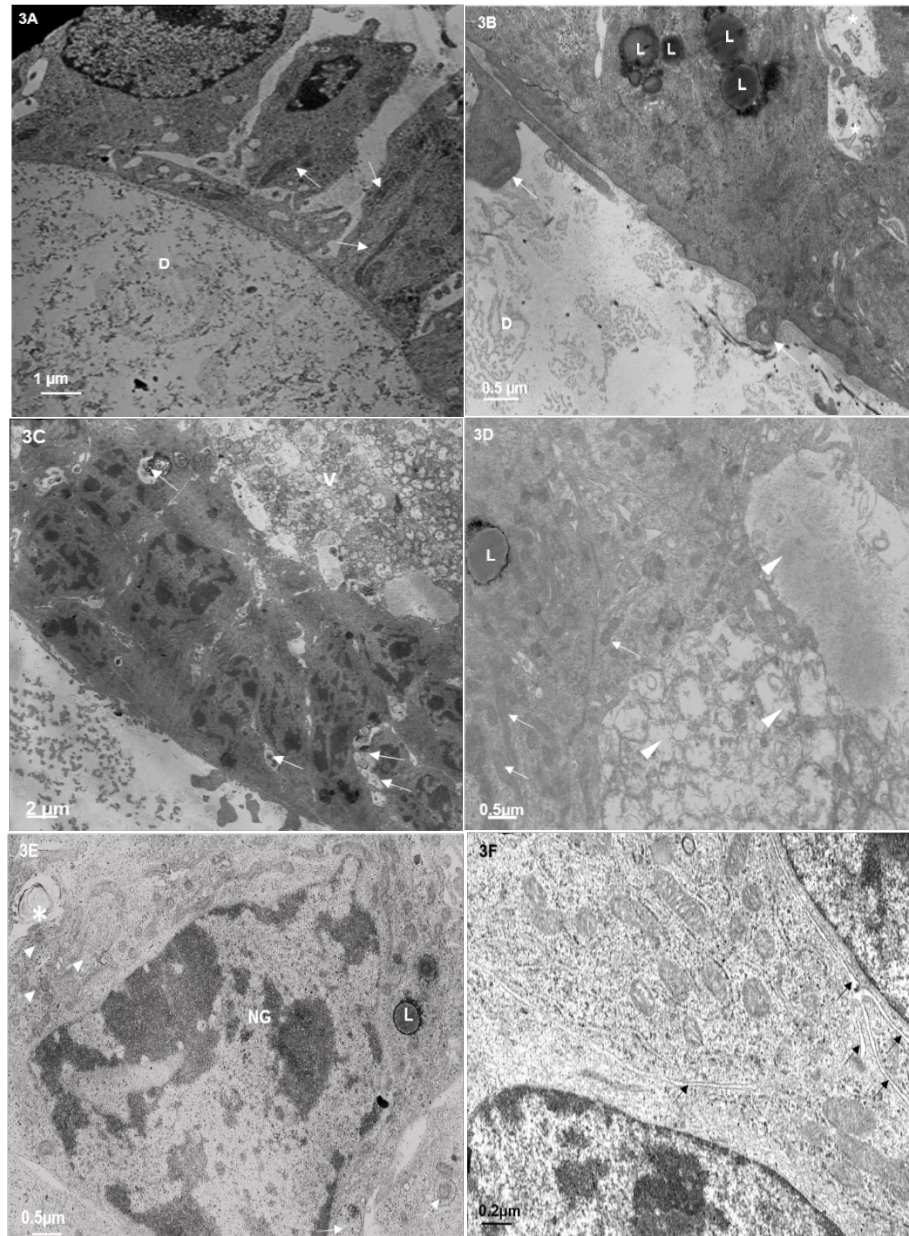


Figure 3. Ultrastructure of bovine immature follicles present in the ovarian cortex treated with OH + NSS immediately after ovary collection at the slaughterhouse. The ovaries were rinsed with 70 % ethanol (OH) and then transported to the laboratory in normal saline solution (NSS) according to an established protocol. A) Degenerated primary immature follicle. Detritus is present (D) in the space corresponding to the oocyte. The granulosa cells are separated and cytoplasmic residue is evident in each cell. Inside the cytoplasm, mitochondrial remains are present (arrows). B) The empty space with cell detritus (D) left by the disintegrated oocyte is shown. The electron dense cytoplasm of the granulosa cells has some irregular extensions towards the hollow space (thin arrows). Some mitochondrial remnants are evident in autophagic areas (asterisks). A lipid droplets can be observed (L) C) A secondary follicle with a large number of vesicles (V). The remaining organelles are part of the immature follicle. Marked autophagic areas in the cytoplasm of the granulosa cells are indicated (arrows). D) An abundant quantity of vesicles containing residues of organelles from the death oocyte (arrowheads). Abundant elongated mitochondria are present in the well conserved cytoplasm of the granulosa cells (arrows). A lipid droplet (L) and the nucleus (NG) are shown. E) Granulosa cell included within a primary follicle with a complete nucleus (NG) in which heterochromatin and euchromatin can be observed. One lipid droplet (L) surrounded by polysaccharides and the presence of autophagy residual bodies (arrows) can be observed in the cytoplasm. Note the presence of the mitochondria and endoplasmic reticulum (arrowheads) in the proximity of the autophagy area (asterisk). F) The intercellular space between granulosa cells (thin arrows), and abundant mitochondria are shown.

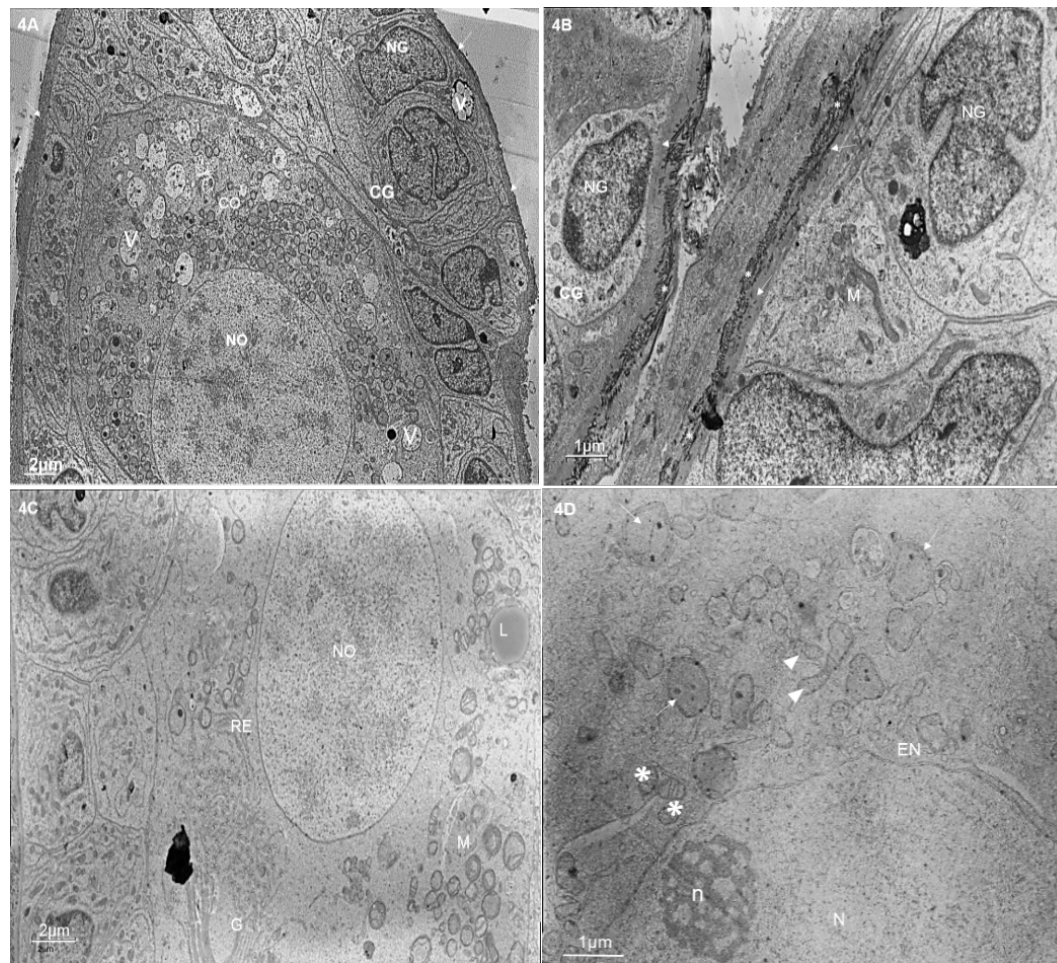


Figure 4. Ultrastructure of bovine immature follicles present in the ovarian cortex, treated with PBS immediately after ovary collection. Ovaries were washed and transported to the laboratory in phosphate buffered saline (PBS) to preserve per an established protocol. Images are presented as follows: A) An intact primary follicle with an intact basal membrane (arrows). Note the integrity of the granulosa cells and the oocyte. NO: oocyte nucleus; CO: oocyte cytoplasm; V: vesicles; NG: granulosa cell nucleus; CG: granulosa cell cytoplasm. B) Granulosa cells from different follicles, previously separated. Note the presence of mitochondria (M) with no alterations, as well as the tight union of the cell membranes of the granulosa cells. The basal membrane is complete, without damage as observed at this level of detection. M: mitochondria; NG: granulosa cell nucleus; CG: granulosa cell cytoplasm; basal membrane (arrows); collagen fibres (asterisks). C) An intact secondary follicle in which both unaltered granulosa cells and immature oocyte as observed at this level of detection. NO: oocyte nucleus; RE: endoplasmic reticulum; M: globular mitochondria; L: lipid droplet. D) Oocytes from primary and secondary follicles with well-defined cristae (asterisks), mitochondria in process of globular formation (arrowheads), and globular mitochondria (arrows). This morphology dynamic was observed in all of the immature oocytes; however, no signs of autolysis or immature oocyte degeneration are shown. N: nucleus; n: nucleolus; EN: nuclear envelope.

of the mitochondria in the oocyte differed greatly from those of the granulosa cells. Most of the mitochondrial groups in the oocytes were globular, with the presence of lipid droplets; the cristae remained in some of the mitochondria while others were just spherical with their double membranes intact. Areas in which mitochondrial groups in different morphological stages or in the process of globular formation were also evident (Figures 4C and 4D), while the typical mitochondria with oval or rounded rod-like shape, as seen in the granulosa cells, were not present. Importantly, no signs of autolysis or degenerative processes, such as those found in the immature follicles treated with OH + NSS, were found.

Only the preantral follicles were evaluated because the objective of the study was to describe the quality of the follicles that are part of the quiescent pool in the ovarian cortex of female cattle. Proper functioning of the ovary is critical to maintain fertility and overall health, and ovarian function depends on the maintenance and normal development of ovarian follicles. The potential impact of oxidative stress induced for 70 % ethanol during ovary collection on the immature follicles was evident, and the comparison of the percentage of morphologically normal follicles obtained in this study using OH + NSS and PBS (36.9 % vs 88.6 %) revealed this degenerative process. Rodrigues et al.¹⁷ reported a lower percentage of follicle normalcy with PBS treatment than that obtained in the present study (88.6 % vs 77 %). Similar results were reported when the percentages obtained in this study were compared with those from other studies using ethanol for ovary asepsis, of 75 %, 76 % and 68.1 %, respectively.^{9,15,16}

Alterations in morphology result from complex mechanisms that signal the start or degree of advancement of the atresia process at cellular level, and a wide variety of such alterations have been evaluated to demonstrate their correlation with the atresia signs at histological or ultrastructural level.^{23,24} Among histological variables, some that stand out are follicle crenation, the presence of vacuoles, organization of follicular cells around the immature oocyte, and nuclear integrity, all of which were found more frequently in this study. However, the number of morphological alterations increased in follicles treated with OH + NSS. Borges et al.¹⁰ reported this type of alterations in sow atretic immature follicles treated with an aseptic protocol similar to the OH+NSS treatment in the present study. Even though the atresia signs can accumulate during folliculogenesis, the existence of incomplete development of the metabolic functions, mainly in the immature oocyte mitochondria, has been reported.²⁴ This prevents the oocyte from adequately dealing with the damage caused by the oxygen reactive species induced by ethanol at the ultrastructural level during asepsis. Additionally, damage becomes more evident with the acceleration of the atresia process.²³

Evaluation at ultrastructural level confirmed the damage caused by ethanol included in the OH + NSS treatment for ovary asepsis, mainly in both primary and secondary oocytes from immature follicles, in which only detritus and a great number of vesicles with organelles remains were observed. The combination of all these signs of degenerative changes indicates the occurrence of progressive atresia²³ at the immature oocyte level, unlike the immature follicles treated with PBS, which had no signs of atresia. One study showed that oocyte degeneration is the type of atresia more frequently observed in preantral follicles of this kind.²⁵ Nonetheless, in the granulosa cells of most of the follicles treated with OH + NSS no signs of atresia were observed. This observation agrees with other studies^{10,25} reporting that in

some preantral follicles, oocyte can degenerate or disappear completely, while the granulosa cells remain healthy and even continue to proliferate, indicating that the oocyte is more susceptible to degeneration than its own granulosa cells.

Conclusions

The present study demonstrates that 70 % ethanol should not be used as an aseptic during ovary collection when the aim is to obtain and evaluate immature follicle stages. These results clearly show that the oocytes present in immature follicles undergo complete alteration. The use of buffer solutions, such as PBS, is recommended for aseptic collection and transport of ovaries to the laboratory. This will guarantee the integrity of immature follicles that can be used to conduct studies to evaluate the efficiency of the development and viability of immature follicles found in bovine ovarian cortical tissue with or without cryopreservation under laboratory conditions.

Funding

Jadiel Leonel Cisneros Prado is grateful for a thesis grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Acknowledgements

The authors thank Juan Antonio López Orosco, Rosa María Cordero Pulido, Oscar Enrique Zarate Guevara, Alejandro Marmolejo Valencia and Adriana Castro Domínguez for providing technical assistance.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author contributions

Jadiel Leonel Cisneros Prado: conducted the experimental work, designed the research and wrote the manuscript.

Felipe Montiel Palacios: reviewed the manuscript and transcribed into English.

Rodolfo Canseco Sedano: performed results, reviewed the statistical analysis and drafting the manuscript.

Horacio Merchant Larios: conducted the research, interprets results and reviewed the manuscript.

References

1. Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 2005;63:1717-51. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.005.
2. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*. 2002;78:203-16. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00091-5.

3. Asgari F, Valojerdi MR, Ebrahimi B, Fatehi B. Three dimensional *in vitro* culture of preantral follicles following slow-freezing and vitrification of mouse ovarian tissue. *Cryobiology*. 2015;71:529-36. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.11.001.
4. Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2191-6. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.12.073.
5. Valente B, Alvares P, Hayashi J, Lopes B, Colombo MH, Gaitkoski D, Basso AC, Arnold DR, Marcondes M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*. 2016;85:1147-51. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.029.
6. Santos RR, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, Paris M, Schoenfeldt V, Martinez-Madrid B. Criopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim Reprod Sci*. 2010;122:151-63. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.010.
7. Dittrich R, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, Ven H, Montag M. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertil Steril* 2012;97(2):387-90. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.047.
8. Rodriguez C, Rocha V, Penitente JM, De Azevedo JL, Gomes R, Alves CA. The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology*. 2016;85:1019-29. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.007.
9. Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro SV, Lopes CAP, Santos RR, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Anim Reprod Sci*. 2013;138:220-27. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.015.
10. Borges EN, Silva RC, Futino DO, Rocha-Junior CMC, Amorim CA, Bão SN, Lucci CM. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effects of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*. 2009;59:195-200. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.07.003.
11. Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *P Nutr Soc*. 2006;65:278-90. doi: 10.1079/PNS2006496.
12. Hernández-Rodríguez S, Gutiérrez-Salinas J, García-Ortíz L, Mondragón-Terán P, Ramírez-García S, Núñez-Ramos NR. Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Med Int Mex*. 2014;(30):295-308.
13. Devine PJ, Perreault SD, Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biol Reprod*. 2012;86(2):27. doi: 10.1095/biolreprod.111.095224.
14. Amorim CA, Rodrigues APR, Rondina D, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Giorgetti A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril*. 2003;79(1):682-86. doi: 10.1016/S0015-0282(02)04820-3.
15. Celestino J, Rodrigues R, Lopes C, Sousa F, Matos M, Melo M, Nair S, Ribeiro A, Viana J, Figueiredo J. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*. 2008;108:309-18. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.08.016.
16. Lopes CAP, Rodrigues APR, Celestino J, Melo M, Nogueira R, Cabral C, Viana J, Bão SN, Jewgenow K, Figueiredo J. Short-term preservation of canine pre-

- antral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Anim Reprod Sci.* 2009;115:201-14. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.12.016.
17. Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci.* 2004;84:211-27. doi: 10.1016/j.anireprosci.2003.12.003.
 18. Cavalcante AYP, Gouveia BB, Barberino RS, Lins TLBG, Santos LP, Gonçalves RJS, Celestino JJH, Matos MHT. Short Communication: kit ligand promotes the transition from primordial to primary follicles after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue. *Zygote.* 2015;1-5. doi: 10.1017/S0967199415000556.
 19. Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, Van Haeften T, Van den Hurk T. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res.* 2006;325:523-531. doi: 10.1007/s00441-006-0193-5.
 20. Fransolet M, Labied S, Henly L, Masereel MC, Rozet E, Kirschvink N, Nisolle M, Munaut C. Strategies for using the sheep ovarian cortex as a model in reproductive medicine, *PLoS One.* 2014;9(3):e91073. doi: 10.1371/journal.pone.0091073.
 21. Hayashi M, Hariya M, Kayano M, Suzuki H. Brief communication. Distribution of follicles in canine ovary - A simple and rapid method for counting follicles. *Cryobiology.* 2015;71:514-51. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.08.014.
 22. Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol.* 1993;37:407-15.
 23. De Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuman G, Van Haeften M, Looman CWN, Te Velde ER. Ultrastructure of the resting ovarian follicle pool in healthy young women. *Biol Reprod.* 2002;66:1151-60. doi: 10.1095/biolreprod66.4.1151.
 24. Paulini F, Carvalho R, Jivago JL, Lucci CM. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *J Ovarian Res.* 2014;7:102. doi: 10.1186/s13048-014-0102-6.
 25. Lucci CM, Rumpf R, Figueiredo JR, Bão SN. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology.* 2002;57:1467-83. doi: 10.1016/S0093-691X(02)00641-6.

3.0 CAPITULO 3

Eficiencia crioprotectora de los métodos de curva lenta y vitrificación en folículos preantrales de tejido ovárico cortical bovino proveniente de rastro.

Efectos crioprotectores de los métodos de curva lenta y vitrificación en folículos preantrales de tejido ovárico cortical bovino proveniente de rastro.

3.1 RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar en los folículos preantrales provenientes de tejido ovárico cortical (TOC) bovino los efectos de los métodos de criopreservación de curva lenta y vitrificación. Fragmentos de TOC bovino fueron asignados en seis tratamientos (n=36 por tratamiento): No tratado (Control), criopreservado por curva lenta usando diferente crioprotector como etilenglicol (EG), dimetilsulfoxido (DMSO) o glicerol (GLI); y criopreservados por el método de vitrificación, sea convencional (VC) o directo en funda (VDF). Luego de la descongelación/calentamiento en cada tratamiento fueron analizados: a) la morfología folicular, mediante cortes histológicos teñidos con H&E en base a su calidad buena y estadio de desarrollo; b) la viabilidad, mediante aislamiento mecánico y enzimático de folículos preantrales presentes en TOC expuestos a tinción supravital con azul tripan, los viables se tiñeron y los muertos no; y c) la integridad ultraestructural, mediante cortes finos contrastados con uranilo y plomo, vistos bajo microscopio electrónico de transmisión. La evaluación morfológica indicó solo un 18.7% de calidad Buena en el total de folículos analizados. No se encontró diferencia en el porcentaje de folículos morfológicamente Buenos entre tratamientos ($p=0.1276$). Sin embargo, al analizar los porcentajes por estadio de desarrollo, los folículos primordiales tratados con EG mostraron mayor porcentaje de morfología Buena que los del grupo DMSO ($p=0.043$), pero no difirió con los grupos GLI, VC y VDF ($p>0.05$). Las alteraciones más frecuentes en folículos preantrales calidad regular fueron: desorganización de las células granulosa que rodean al ovocito (28.5%) y desprendimiento parcial o completo de las células de la granulosa con el ovocito (25.3%). El análisis de viabilidad sólo indicó diferencia de porcentajes entre folículos en estadios primarios, favoreciendo al grupo Control comparado con el grupo GLI ($p=0.035$). El análisis ultraestructural indicó que los folículos tratados con EG y VDF fueron los que menos alteraciones presentaron en sus células de la granulosa y citoplasma del ovocito en comparación al Control. La presencia de uniones adherentes entre células de la granulosa, y microvellosidades entre ovocito y células de la granulosa fueron los principales tipos de unión observadas. El organelo de mayor abundancia en el citoplasma del ovocito fue la mitocondria, en sus diversas formas inmaduras. La presencia de actividad autofágica en varios estadios de avance estuvo presente en los ovocitos de folículos preantrales Control y criopreservados, su característica principal fue la presencia de vesículas con doble membrana secuestrando o degradando ciertos elementos citoplásmicos. El presente estudio demostró que el método de VDF fue el mejor en preservar morfología, viabilidad y ultraestructura en folículos preantrales provenientes de tejido ovárico cortical bovino, previamente criopreservado. También fue posible determinar la presencia de un proceso poco descrito en folículos preantrales denominado autofagia, que esta relacionado con la preservación de la homeostasis foliculo preantral y es posible que modifique e intervenga en el proceso de oleadas foliculares tempranas en el bovino.

Palabras clave: criopreservación, folículo, preantral, bovino, autofagia, ultraestructura, morfología, viabilidad.

3.2 INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han demostrado que la criopreservación de embriones (Kuwayama, 2007; Stachecki *et al.*, 2008; Dalcin and Lucci, 2010) y ovocitos maduros (Metafase II) es posible (Borini *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2010; Díez *et al.*, 2012), sin embargo se ha determinado que presentan ciertas desventajas prácticas (París *et al.*, 2009). Desde los costos de obtención de embriones y los procedimientos repetidos de estimulación hormonal que dependen del estatus del ciclo estrual, el número de embriones viables colectados por hembra (5-7, promedio mundial), y además estos procedimientos no son viables en animales prepúberes (Pontes *et al.*, 2010).

Si bien se sabe, los ovocitos maduros se encuentran estáticos en la segunda metafase de la división meiótica, momento en el cual la célula está bien organizada en unión a su zona pelúcida, uso meiótico desarrollado y gránulos corticales dispersos en abundancia (ASRM, 2006). Además, se ha notificado que la criopreservación de ovocitos maduros puede inducir una liberación prematura de los contenidos gránulo-corticales y en consecuencia endurecer la zona pelúcida (Woods *et al.*, 2004). También, se ha reportado que la criopreservación puede causar anomalías cromosómicas, como son aneuploidias, debido a alteraciones del uso meiótico y el citoesqueleto en ovocitos maduros (Mandelbaum *et al.*, 2004). Sin embargo, existe la posibilidad que estos problemas no se presenten cuando los folículos preantrales dentro del tejido ovárico cortical (TOC) son criopreservados, debido que son menos diferenciados, poseen pocos organelos, ausencia de zona pelúcida y gránulos corticales, además, presentan una escasa actividad metabólica y se encuentran estacionados en la profase de la meiosis I (Isachenko *et al.*, 2003).

Usualmente existen dos métodos avalados para la criopreservación: la curva lenta y la vitrificación, con sus diversas variantes. La curva lenta utiliza una máquina programable con un recipiente criogénico y es tradicionalmente empleada para la congelación de ovocitos, embriones o TOC, en un proceso que puede tomar varias horas (Isachenko *et al.*, 2007). La vitrificación se ha considerado como el método alternativo, con elevadas concentraciones de crioprotectores y rápida velocidad de enfriamiento, que transforma las células a un estado vítreo amorfo, sin formación de cristales de hielo (Kuwayama, 2007). Los resultados acerca del método más eficiente para llevar a cabo la criopreservación de TOC en bovinos son divergentes, e incluso existe poca información en dicha especie.

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la eficiencia de las técnicas de criopreservación sobre la viabilidad e integridad de los folículos preantrales provenientes de TOC bovino luego de revertir los procesos criogénicos.

3.3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1 Recolección, transporte y preparación de tejido ovárico cortical bovino

Los ovarios (n=36) de hembras bovinas se recolectaron seguido de su sacrificio en el rastro municipal TUMFA, localizado en el municipio de Manlio Fabio Altamirano, Ver., y únicamente se seleccionaron de hembras en rangos de 3 a 6 años de edad (evaluada con base al desgaste de los dientes incisivos; Raines *et al.*, 2008), que mostraban signos de ciclicidad ovárica (presencia de cuerpo lúteo) y no debieron provenir de corral de engorda. Primero los ovarios se lavaron con solución salina bufferada con fosfatos (PBS; Bioniche LSI, USA) dos veces, luego se colocaron en medio de transporte a base de PBS + 0.05% de sulfato de gentamicina (Gentalex fuerte, PISA, MX; Cisneros *et al.*, 2017), posteriormente se trasladaron hasta el laboratorio de fertilización *in vitro* de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana en un tiempo aproximado de 1-3 h. De inmediato, cada ovario fue seccionado para obtener al menos 6 pequeñas piezas (~2 mm X ~1 mm X 1 cm) de corteza con ayuda de pinzas de disección y hoja de bisturí (núm. 12). Dicho tejido se asignó de manera aleatoria en cada uno de los 6 tratamientos siguientes (n=36 por tratamiento): No criopreservado (Control); Criopreservado mediante el método de curva lenta utilizando diferentes agentes crioprotectores como etilenglicol (EG), Dimetil Sulfóxido (DMSO) o Glicerol (GLI); y Criopreservados mediante el método de vitrificación, fuese convencional (VC) o directo en funda (VDF).

3.3.2 Criopreservación de TOC bovino

3.3.2.1 Curva lenta/descongelación

El efecto de tres agentes crioprotectores diferentes para el método de curva lenta fueron comparados: Glicerol al 10% (GLI; Sigma-Aldrich, USA), Dimetil sulfóxido 1.5 M (DMSO; Sigma-Aldrich, USA), Etilenglicol 1.5 M (EG; Sigma-Aldrich, USA). Todas las soluciones crioprotectoras se prepararon en un medio base de Dulbecco's buffer fosfato salino (DPBS, Gibco, USA) más Sucrosa 0.4 M (Sigma-Aldrich, USA). Brevemente cada muestra se colocó en viales criogénicos de 1.8 ml (Corning, USA), con 1 ml de solución crioprotectora, se incubó a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se congelaron utilizando una cámara criogénica programable (Freeze control, CL 5500, AUS). Los crioviales se equilibraron a 20°C por 20 min, después la tasa de enfriamiento fue de 5°C/min, hasta alcanzar los -7°C y permanecer así por 10 min. En este momento se indujo la formación de cristales de hielo (seeding) de forma manual mediante el contacto directo de los crioviales con pinzas hemostáticas pre-enfriadas en nitrógeno líquido (N₂L). El descenso de temperatura se realizó a una velocidad de 0.3°C/min hasta alcanzar los -33 °C. Los crioviales se almacenaron en N₂L, hasta el siguiente procedimiento (Lucci *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004). Los tejidos se descongelaron al exponer los crioviales en aire (temperatura ambiente) por 30s, seguido por la inmersión en agua a 38°C, se agitaron constantemente hasta alcanzar el derretimiento del hielo. El crioprotector se removió lavando las muestras de tejido en tres pasos (cinco min en cada uno); dos de ellos en DPBS adicionado con 0.4 M de Sucrosa y el respectivo crioprotector en concentraciones decrecientes (0.5 y 0.25% respecto a la concentración usada durante la congelación), y uno únicamente en DPBS (Borges *et al.*, 2009).

3.3.2.2 Vitriificación/calentamiento

3.3.2.2.1 Vitriificación convencional (VC)

El medio base utilizado fue DPBS más 20% de sustituto sintético de suero (SSS; Irvine Scientific, USA). Los tejidos se deshidrataron en una secuencia de dos pasos: a) 10% de EG + 10% de DMSO en medio base por 15 min; b) 20% DMSO + 20% de EG + Sucrosa 0.5 M en medio base por 5 min. Al finalizar, cada tejido se transfirió con una pipeta Pasteur y lentamente se liberó directo al recipiente con N₂L. Al solidificarse se colectó con pinzas de disección pre-enfriadas, de inmediato se colocó en crioviales y se almacenó en un termo con N₂L hasta su posterior empleo. Este procedimiento fue con base a la metodología reportada por Isachenko *et al.* (2003) y Zhou *et al.* (2010), diseñados para TOC de ratón.

3.3.2.2.2 Vitriificación directa en funda (VDF)

El medio base fue DPBS + 20% SSS. Los crioprotectores se utilizaron en la siguiente concentración. Solución de equilibrio: 7.5% DMSO + 7.5% EG en medio base. Solución de vitriificación: 15% DMSO + 15% EG + Sucrosa 0.5 M en medio base. El TOC se mantuvo por 10 min en la solución de equilibrio a temperatura ambiente y por 2 min en la solución de vitriificación. Seguido a esto, se colocó sobre gaza estéril para absorber los residuos de la solución de vitriificación. Posterior a ello, el tejido se depositó en crioviales de 1.8 ml y el N₂L fue directamente aplicado sobre el TOC para su vitriificación. Los crioviales se almacenaron en un termo con N₂L hasta su posterior empleo. Este proceso fue con base a la metodología reportada por Chen *et al.* (2006), para TOC humano.

Para calentar los tejidos vitriificados, seguido de la extracción de los crioviales del N₂L, se extrajeron con pinzas las solapas de corteza ovárica. De inmediato el tejido fue transferido secuencialmente en medio de calentamiento (TS: Sucrosa 1 M), seguido por tres medios de dilución (DS1, DS2 y DS3) que contenían Sucrosa a concentraciones decrecientes (0.5, 0.25 y 0.125 M) por 5 min en cada dilución. Por último todo el tejido vitriificado/calentado se mantuvo en un medio de lavado (WS), que fue únicamente medio base, hasta el siguiente proceso.

3.3.3 Análisis de la morfología de folículos preantrales bovinos.

Seis muestras de TOC de cada tratamiento fueron asignadas de manera aleatoria para ser embebidas en parafina, seccionadas (7 µm), teñidas con hematoxilina y eosina, y observadas con microscopio de luz (Optika B150DB-R, Italy). Los folículos observados se categorizaron de acuerdo a su estadio de desarrollo según la siguiente clasificación: a) primordiales (capa sencilla de células pre-granulosa aplanadas), b) primarios en transición (capa simple de células de la granulosa, con una o más células cuboides), y c) secundarios preantrales (dos o más capas de células de la granulosa cuboides, ausencia de antro; van den Hurk and Zhao, 2005). Dichos folículos se contaron clasificaron en 3 calidades de acuerdo a sus aspectos morfológicos generales como: 1) folículos morfológicamente normales (calidad Buena) presentaron citoplasma regular, buen arreglo de las células foliculares, ovocito sin alteraciones; 2) los folículos calidad Regular presentaron ciertas

alteraciones morfológicas como células foliculares desordenadas, presencia de picnosis nuclear esporádica, crenación parcial, vacuolización parcial de citoplasma o núcleo, desprendimiento parcial del ovocito y células de la granulosa, y 3) folículos calidad Mala o degenerados que perdieron estructura morfológica total, debido a una picnosis homogénea, elevada vacuolización, desprendimiento completo de ovocito y células granulosa, presentando citólisis generalizada (Fatehi *et al.*, 2014).

3.3.4 Análisis de la viabilidad de folículos preantrales bovinos

Los folículos preantrales se aislaron de manera individual de los fragmentos TOC bovino mediante deslices mecánicos con hoja de bisturí hasta desgastar el tejido en su totalidad, en cajas de Petri con 10 ml de medio comercial Human Tubal Fluid (HTF modificado®; Irvine Scientific, USA) + 20% de SSS. Éste proceso fue una modificación que se hizo a la metodología reportada por Katska y Rynska (1998), y con base a que la distribución folicular de la corteza ovárica es bastante heterogénea (Hayashi *et al.*, 2015), se indujo una digestión parcial del tejido restante de cada muestra, con la finalidad de disgregar los restos y permitir la mayor liberación de folículos preantrales presentes. Los restos de TOC se colocaron en tubos de centrifuga y por cada ml de HTF modificado se agregaron 200 UI / ml de Colagenasa tipo1 (Sigma-Aldrich, USA; Roy and Greenwald, 1985), el cual se mantuvo en incubación por 2 h a una atmósfera con un 6% de CO₂ a 38.5°C, seguido a ello el tejido se dispersó mecánicamente con ayuda de un vórtex y pipeta Pasteur por 30 min, la digestión fue inhibida mediante la adición de 4 ml de medio HTF modificado, posteriormente se centrifugó a 400 g por 15 min, el pellet se reconstituyó en 100 µl de medio HTF modificado y se adicionaron 40 µl de Tripán azul al 4% (Sigma-Aldrich, USA) para su tinción, por último los folículos preantrales se aislaron y evaluaron bajo un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse TS100, Japan). Como resultado, los folículos viables fueron considerados aquellos que no aceptaron la tinción y los teñidos se consideraron no viables, basado en la metodología y resultados reportados por Fauque *et al.* (2007) y Filipiak y Larocca (2012), sobre la eficiencia de la tinción con tripan azul en la evaluación de la viabilidad en tejido criopreservado y sobre la diferenciación de ovocitos vivos y muertos en bovinos, respectivamente. Para llevar a cabo éste análisis se tomaron en cuenta 24 piezas de tejido cortical ovárico por cada tratamiento.

3.3.5 Análisis ultraestructural de folículos preantrales bovinos

La evaluación de la integridad folicular, se realizó mediante un análisis de la ultraestructura de los folículos preantrales del TOC bovino asignados en los grupos de tratamientos control y criopreservados (n=6 por cada tratamiento) con base a lo reportado en la metodología de Cisneros *et al.*, 2017. Los fragmentos de tejidos se fijaron en líquido de Karnovsky (paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2.5% en buffer cacodilato de sodio al 0.1 M y pH 7.3) por 24 h a 4°C. Después de la fijación, los fragmentos de tejido se lavaron en buffer cacodilato de sodio 0.1 M y mecánicamente fueron aislados con hoja de bisturí mediante un proceso de raspado. La postfijación fue hecha en tetróxido de osmio al 1% en buffer Zelterqvst por una hora. Subsecuentemente, las muestras se deshidrataron en dosis crecientes de alcohol etílico (50, 70, 80, 90 y 100%) de 5-15 min en cada uno (c/u), después en acetonitrilo (dos cambios por 20 min c/u), seguido a ello fueron embebidas en proporciones 1:1 y 2:1 en resina EPON 812 y acetonitrilo, respectivamente, por 1 h en c/u y

por último fueron embebidos en resina EPON 812 por 24h. Los cortes semifinos (1-2 μm) se tiñeron en azul de toluidina. Los cortes finos (60-70 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron bajo un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 100C.

3.3.6 Análisis estadístico

El número de folículos viables y con morfología normal en varios estadios de desarrollo se contaron en cada experimento y se expresan como porcentaje o promedio \pm una desviación estándar, respectivamente. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y prueba de Tukey para determinar las diferencias entre tratamientos. Las principales anomalías morfológicas observadas (variables categóricas) se presentan como valores en porcentajes para microscopía de luz. Un análisis descriptivo y detallado de las características más sobresalientes de la ultraestructura folicular se desglosa. El análisis de datos se realizó con el software Statistica v. 10.0. Se consideró una diferencia significativa con un valor $p < 0.05$.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Análisis de la morfología folicular

Un total de 2064 folículos preantrales fueron evaluados mediante cortes histológicos y teñidos con Hematoxilina & Eosina en los grupos de tejido Control y criopreservado. Sin embargo, únicamente 385 (18.7%) de ellos resultó ser calidad Buena, en tanto que los de calidad Regular ascendieron a 840 (40.7%) y el total de los degenerados calidad Mala fue de 839 (40.6%). Al analizar únicamente los folículos de Buena calidad primordiales, primarios y secundarios su número y porcentaje (%) por clase fue de 296 (14.4%), 52 (2.5%) y 37 (1.8%; Figura 1), respectivamente. Para los folículos de calidad Regular, con algún tipo de alteración morfológica en su estructura, en estadios primordiales, primarios y secundarios su número y porcentaje (%) por clase fue de 518 (25.1%), 240 (11.6%) y 82 (4.0%), respectivamente.

Al analizar y comparar el efecto de los diferentes métodos de enfriamiento, entre los fragmentos de corteza criopreservados y el Control, sobre la integridad morfológica de los folículos preantrales, en general no se observó diferencia en el porcentaje de folículos morfológicamente Buenos entre tratamientos ($p=0.1276$).

Sin embargo, al analizar los porcentajes por estadio de desarrollo entre tratamientos de los folículos clasificados como primordiales si se encontró diferencia entre ellos ($p<0.001$). El porcentaje de folículos en el grupo Control fue similar con el tratamiento EG ($p=0.05$), pero significativamente mayor que aquellos de los tratamientos DMSO, GLI, VC y VDF ($p<0.05$). Al comparar los resultados de los folículos primordiales entre los grupos criopreservados, únicamente aquellos tratados con EG mostraron mayor porcentaje de morfología Buena que los del grupo criopreservado mediante DMSO ($p=0.043$), mientras que entre los otros grupos del mismo estadio (GLI, VC y VDF) no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$). Por consiguiente, en los folículos clasificados como primarios y secundarios tanto en los criopreservados como en su respectivo grupo control, no se hallaron diferencias significativas ($p>0.05$; Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de folículos preantrales con Buena calidad morfológica, en varios estadios en los grupos criopreservados (EG, DMSO, GLI, VC y VDF) y no criopreservados (Control).

Grupos	Control	EG	DMSO	GLI	VC	VDF
Primordial	43.6±4.0a (102/234)	23.0±6.5ab (59/256)	8.2±1.8c (15/182)	14.8±3.2bc (36/243)	17.6±3.1bc (50/284)	16.0±4.3bc (34/213)
Primario	12.3±1.5 (8/65)	13.0±2.1 (14/108)	7.7±0.9 (6/78)	11.8±1.9 (10/85)	9.7±1.6 (9/93)	8.1±0.8 (5/62)
Secundario	36.4±1.5 (8/22)	22.2±1.8 (10/45)	16.4±0.5 (4/24)	20.0±0.8 (5/25)	36.0±1.6 (9/25)	5.0±0.4 (1/20)

Los datos se expresan como porcentajes ± una DE. Los valores entre paréntesis son el número de folículos con morfología Buena observados durante la evaluación histológica de tejidos.

a, b, c Literales diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos, para el estadio de desarrollo por fila ($p<0.05$).

Respecto a las principales alteraciones halladas en los folículos preantrales de calidad Regular fueron: crenación parcial (14.2%) o completa (10.7%), vacuolización citoplásmica del ovocito (9.4%), vacuolización del complejo folículo/ovocito (5.8%), desorganización de

las células granulosa que rodean al ovocito (28.5%), desprendimiento parcial o completo de las células de la granulosa con el ovocito (25.3%), picnosis nuclear (4.1%) y sólo un 2% de folículos con multinucleación (Figuras 2 y 3). Para el caso de los folículos calidad Mala, que degeneraron, cabe mencionar que presentaban más de dos de las alteraciones previamente mencionadas a la evaluación y no se encontró diferencia significativa entre grupos ($p>0.05$).

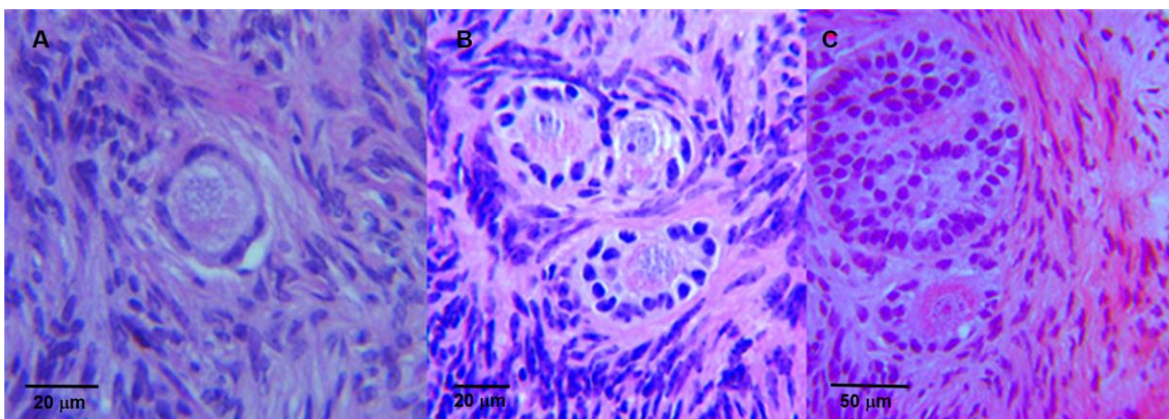


Figura 1. Folículos preantrales: primordial (A; 40X), primario (B; 40X) y secundario (C; 20X), de calidad Buena, presentes en tejido ovárico cortical bovino no criopreservado.

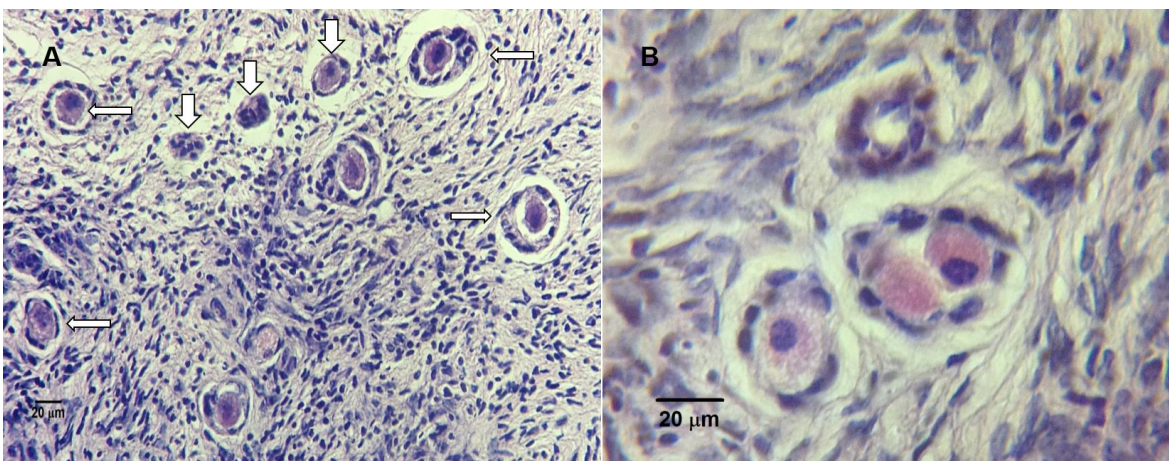


Figura 2. Principales alteraciones encontradas en folículos preantrales presentes en fragmentos de TOC bovino de calidad Regular, en la imagen **A** se presenta crenación parcial (flecha delgada) y completa (flecha gruesa) de folículos primarios y secundarios (10X). La imagen **B** muestra la presencia de dos ovocitos que comparten el mismo folículo y presentan crenación (40X).

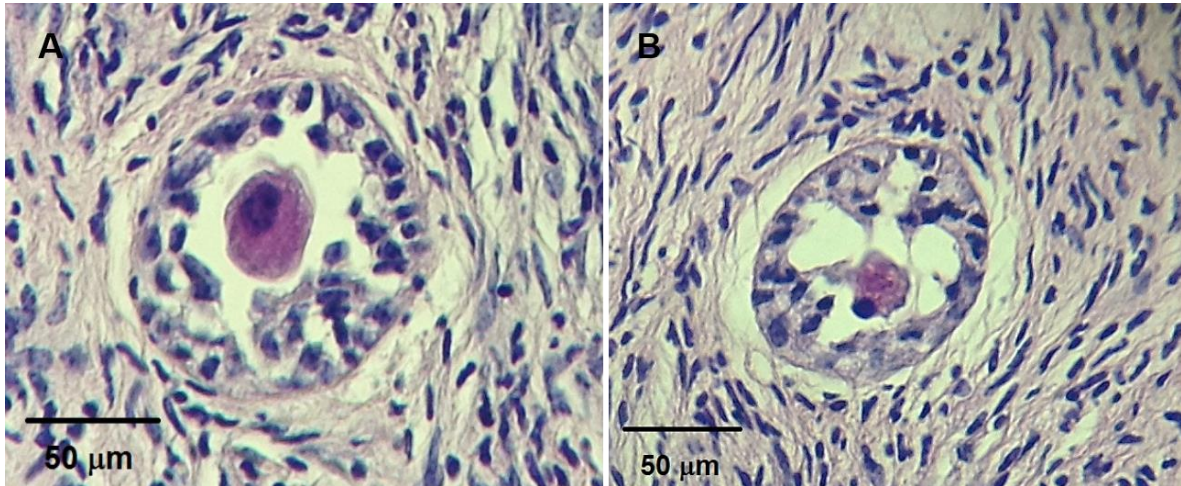


Figura 3. Desprendimiento completo (A) y parcial (B) de las células de la granulosa con el ovocito preantral (100X).

3.4.2 Análisis de la viabilidad folicular

Un total de 1861 folículos preantrales fueron evaluados con tripan azul y se obtuvieron 1382 (74.3%) viables, con una media de 230.33 ± 67.99 folículos analizados por tratamiento (Figura 4). Considerando todos los tratamientos, 765 folículos fueron clasificados como primordiales, 399 como primarios y 221 como folículos secundarios, esto indica una diferencia significativa con respecto al número de folículos en cada estadio de desarrollo ($p < 0.0001$). En general, el promedio de folículos preantrales viables no fue diferente ($p = 0.1304$) entre tratamientos (Figura 5). Posteriormente, al comparar el promedio de folículos viables por estadio de desarrollo entre tratamientos, no se encontró diferencia significativa para los estadios primordiales ($p = 0.1765$) y secundarios ($p = 0.9947$), pero si hubo diferencia entre los primarios ($p = 0.0162$). Resultando en un promedio mayor de folículos viables el grupo control a diferencia de aquellos folículos dentro del grupo GLI ($p = 0.035$; Figura 6).

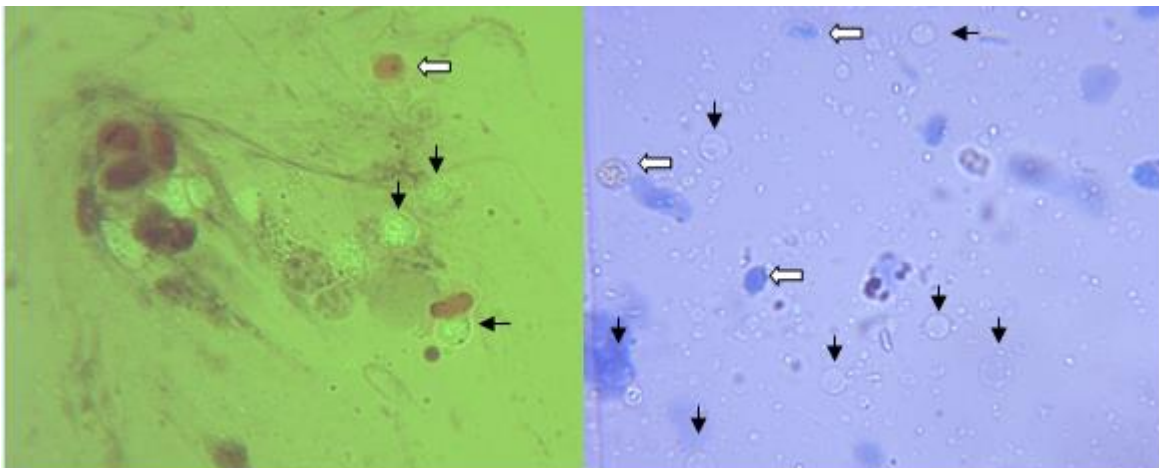


Figura 4. Folículos preantrales teñidos con tripan azul para evaluar su viabilidad, los teñidos intensamente se consideraron muertos (flecha gruesa) y los no teñidos fueron considerados como vivos (flecha delgada).

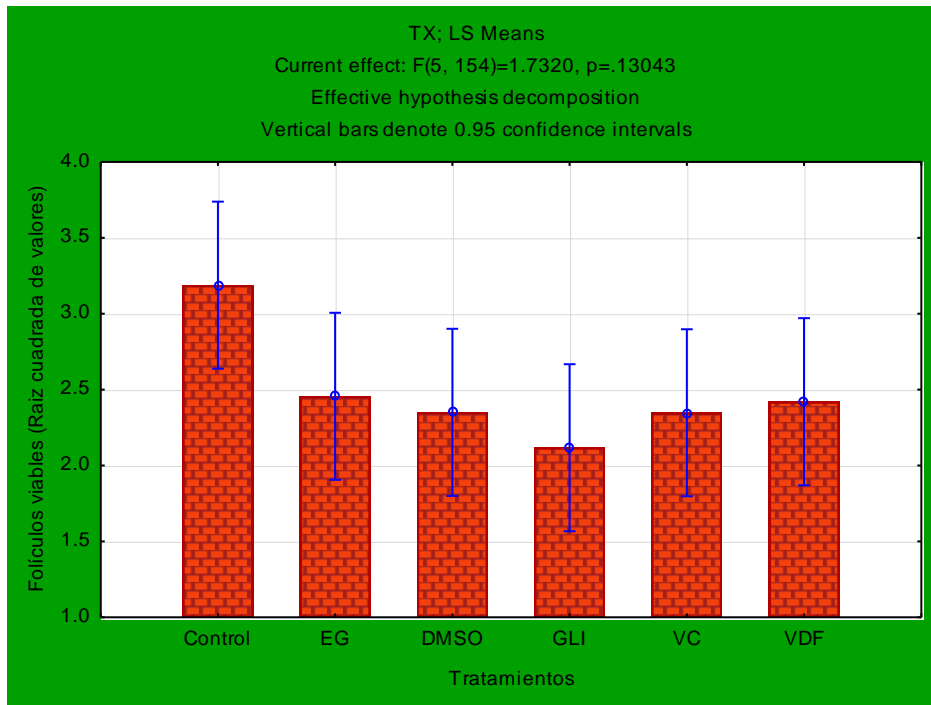


Figura 5. En esta gráfica se puede apreciar que no existe diferencia del promedio de folículos preantrales entre tratamientos. El número de folículos viables se expresa en valor de la raíz cuadrada de los valores originales para satisfacer los supuestos de homogeneidad de varianzas.

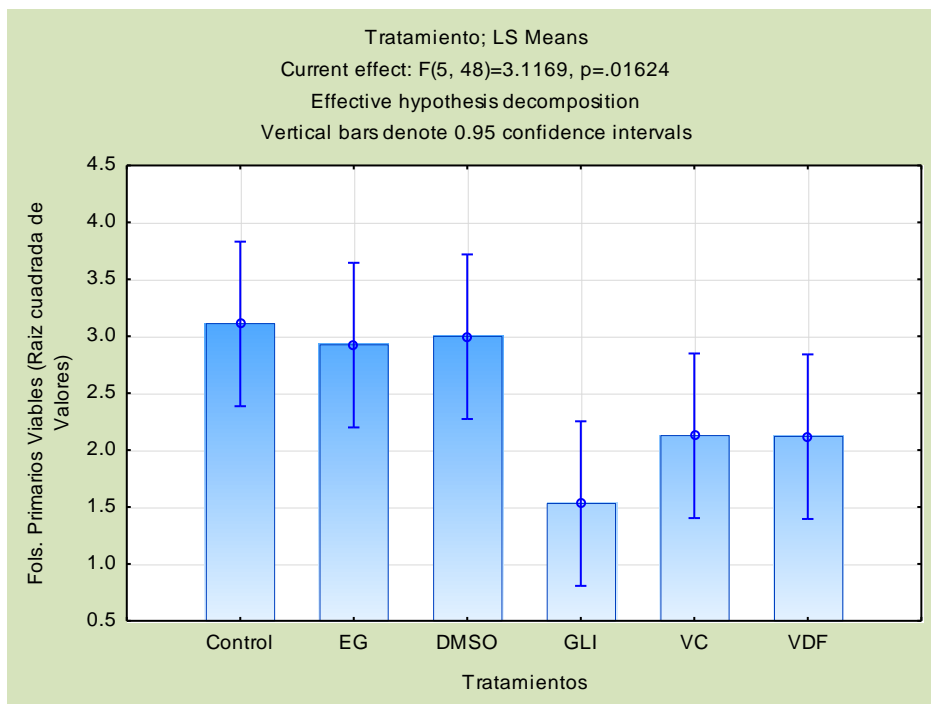


Figura 6. Este gráfico indica diferencia en el promedio de folículos viables entre el grupo Control y GLI, pero sin diferencia estadística con el resto de grupos (EG, DMSO, VC y VDF; $p > 0.05$). El número de folículos primarios viables se expresa en valor de la raíz cuadrada de los valores originales para satisfacer los supuestos de homogeneidad de varianzas.

3.4.3 Análisis de la ultra-estructura folicular

3.4.3.1 Folículos preantrales bovinos no criopreservados (Control)

Los folículos preantrales correspondientes al grupo control presentaron buena integridad y morfología, así como una estrecha asociación entre ovocito y células de la granulosa, inclusive fue posible apreciar a este nivel de magnificencia la integridad de la membrana basal de dichos folículos en cortes semi-finos. La presencia de la membrana basal íntegra indica que el proceso mecánico-enzimático mediante el cual se aislaron los folículos fue lo suficiente mente seguro como para no dañarlos y comprometer su integridad (Figura 7).

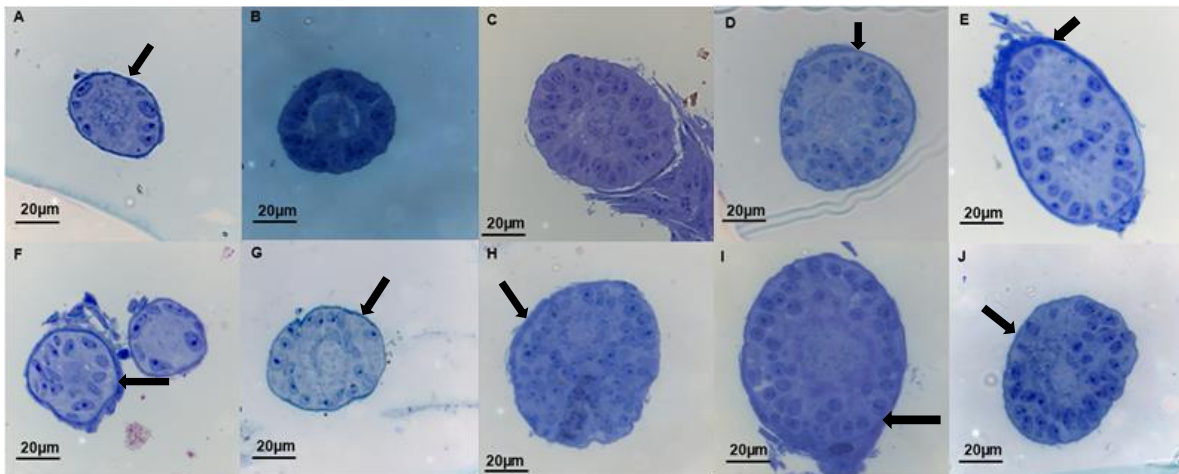


Figura 7. Folículos preantrales primarios (A, B, F, G), secundarios (C, D, E, H, I, J) y primordial (F), calidad Buena, aislados de TOC bovino del grupo Control (No Criopreservado) y teñidos con azul de toluidina. Magnificencia de la imagen 40X.

La ultra-estructura de los folículos permite apreciar con detalle la estrecha unión y distribución de los componentes folículo preantrales. Dentro de ellos destacan las membranas basales (Flechas delgadas con doble cabeza) que presentaron una elevada cohesión de sus componentes a base de fibras de colágeno (Flechas gruesas) principalmente, y que dan soporte y firmeza a las células foliculares de la granulosa adyacentes (Figuras 8A, 8B 8C, 10C, 10D y 10E). Las células de la granulosa se caracterizaron por poseer núcleos pleomórficos, con presencia de cromatina dispersa y heterocromatina en ciertas áreas (Figuras 8A, 8B y 8C). Las mitocondrias de estas células fueron abundantes y pequeñas, algunas con forma arriñonada o esférica con diversas longitudes y sus crestas transversas o longitudinales se notaron bastante diferenciadas, así como su doble membrana que separa a la matriz mitocondrial del citoplasma celular. Su distribución en el citoplasma no presentó patrones de localización alguna. Los organelos como retículo endoplásmico liso y rugoso de forma aplanada se observaron con frecuencia por todo el citoplasma celular, con sus respectivos ribosomas, lo cual sugiere que estos organelos se encuentran bajo una elevada actividad metabólica de síntesis proteica y/o esteroidea (Figuras 8A, 8B, 10C y 10F). La presencia de aparato de Golgi, lípidos, lisosomas o vesículas fue escasa. Al mismo tiempo de evaluación, no se observaron indicios de procesos de muerte celular programada, tales como apoptosis. Durante la

evaluación de las células de la granulosa, bajo el microscopio electrónico de transmisión, el daño máximo encontrado fue menor a una célula por cada 35 evaluadas (2.86%) en el grupo Control.

Cabe señalar que las uniones entre membranas de las células de la granulosa sólo fueron del tipo adherente. No obstante entre membranas de las células de la granulosa y el ovocito inmaduro de los folículos preantrales sí fue posible observar áreas de íntimo contacto conocidas como micro-vellosidades, que son indispensables para el intercambio de sustancias entre ambas células mediante procesos de difusión.

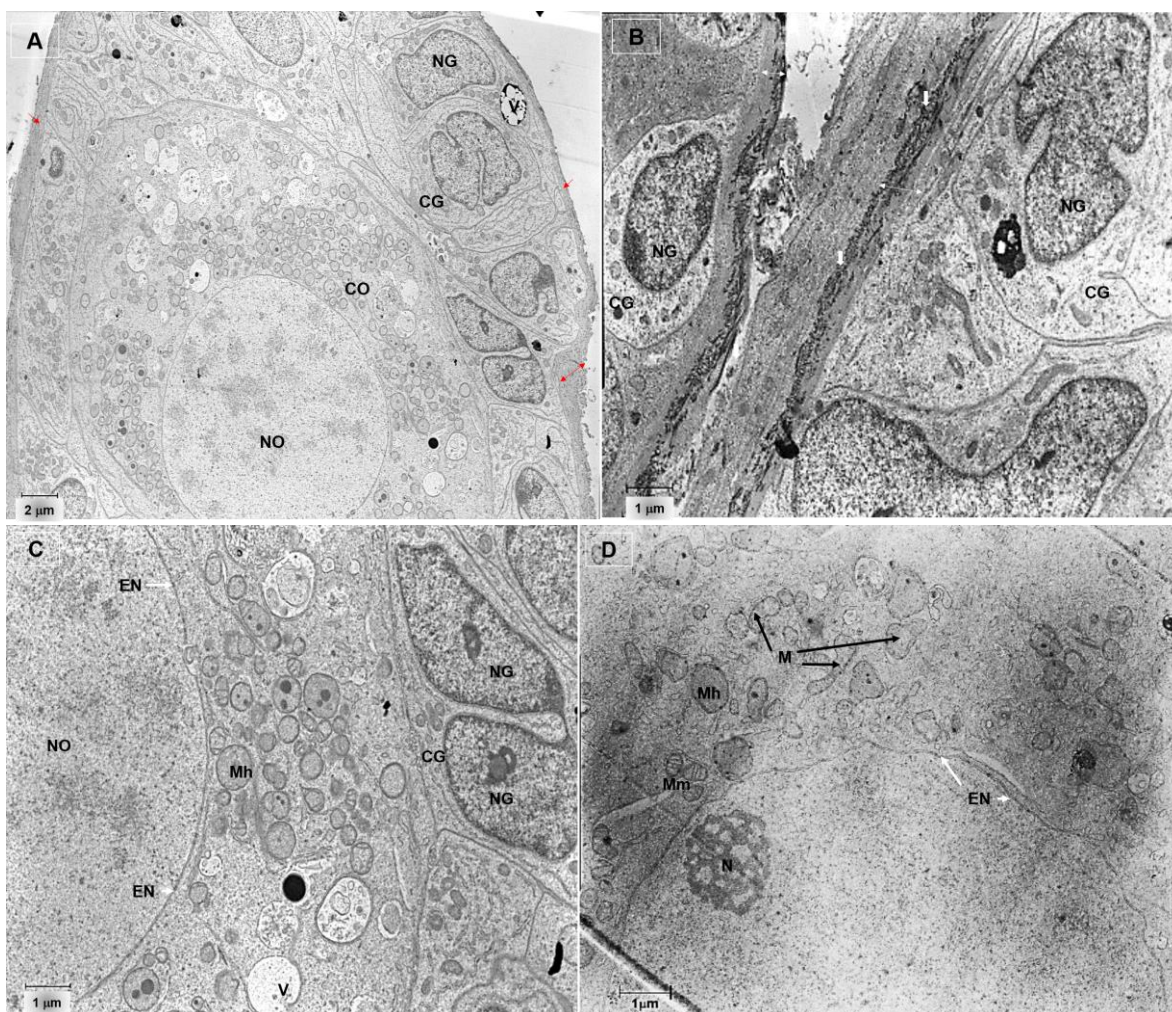


Figura 8. Ultra-estructura de folículos preantrales primarios bovinos del grupo Control (No Criopreservado). Núcleo del ovocito (NO), Citoplasma del ovocito (CO), Núcleo de la célula de la granulosa (NG), Citoplasma de la célula de la granulosa (CG), Mitocondrias maduras con crestas (Mm), Mitocondrias en proceso de maduración (M), Mitocondrias hinchadas o globulares inmaduras (Mh), Vesícula (V), Envoltura nuclear (EN), Nucléolo (N).

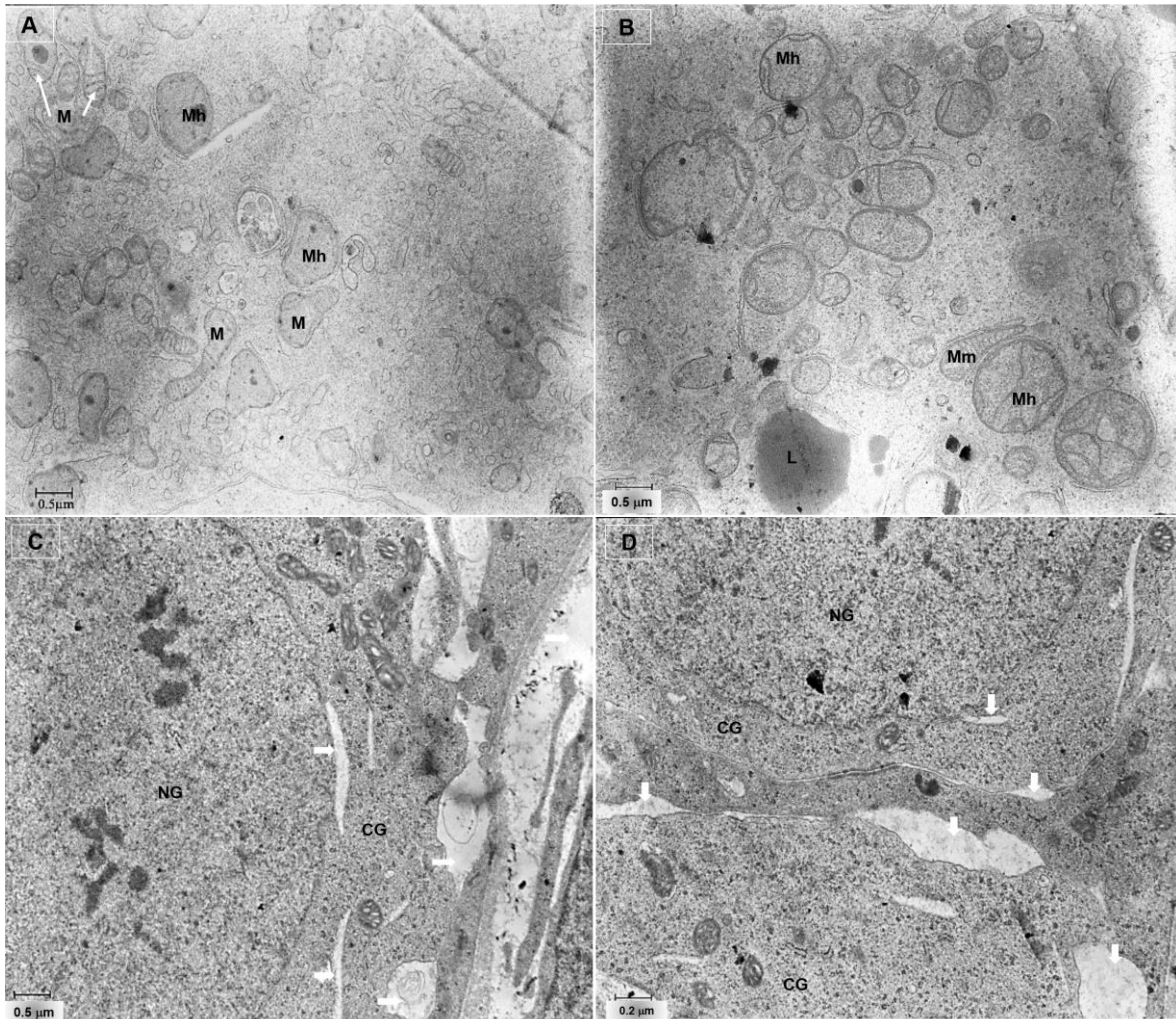


Figura 9. Ultra-estructura de folículos preantrales primarios bovinos del grupo Control (No Criopreservado) vistos a un mayor enfoque (500 y 200 nm). En la imagen **A** y **B** se observan mitocondrias maduras (Mm) con crestas, Mitocondrias en proceso de maduración (M), Mitocondrias hinchadas (Mh) y una Gota Lipídica (L) dentro del citoplasma del ovocito inmaduro. En las imágenes **C** y **D** se inicia la deposición de polisacáridos que han de constituir la zona pelúcida (Flechas) del ovocito en desarrollo y rodeado por las células de la granulosa.

Por otro lado, en los ovocitos inmaduros de los folículos preantrales en sus tres estadios de desarrollo (primordial, primario y secundario), se mostraron morfológicamente ovoides o esféricos con un citoplasma homogéneo. El núcleo se localizó siempre en posición central al ovocito, rodeado por su doble envoltura de apariencia lisa y escasos poros. La cromatina no se encontró condensada y un único nucléolo por ovocito inmaduro fue observado. Dentro de las estructuras citoplásmicas más abundantes, dispersas y sobresalientes en los ovocitos inmaduros de folículos preantrales se encontraron las mitocondrias, con formas esféricas en diversos estadios de diferenciación, esto nos sugiere un estado inmaduro de los organelos, que conforme aumenten sus funciones metabólicas en el ovocito inmaduro con respecto al estadio de desarrollo folicular, puedan alcanzar su forma elongada con una formación simultánea o gradual de crestas. Además, éste tipo de organelo presentó esporádicamente gotas lipídicas en su interior y sus dobles membranas periféricas se observaron intactas. Estas mitocondrias en conjunto al retículo endoplásmico distribuido

ampliamente por el citoplasma con sus cisternas que se observaron bien definidas, así como su estructura tubular y aplanada, se asociaron a un proceso escasamente descrito en folículos preantrales bovinos conocido como autofagia, en el cual dichas estructuras fueron secuestradas por una doble membrana separada por una cisterna intermedia. Este proceso se observó constantemente en los ovocitos de folículos preantrales evaluados, pero sin indicar un daño progresivo que sugiera muerte celular a nivel de microscopia electrónica sea por fragmentación citoplásmica o condensación del núcleo (Figuras 9, 10 y 11).

Otro aspecto importante a resaltar fue la presencia de células de la teca interna que se observaron ocasionalmente adheridas en la cara externa de la membrana basal de los folículos secundarios preantrales. Estas células de la teca se mostraron completamente integras en su totalidad, y sus grupos mitocondriales no presentaron alteraciones. El núcleo presentó tanto heterocromatina como eucromatina en su interior y una envoltura sin daño aparente (Figura 10).

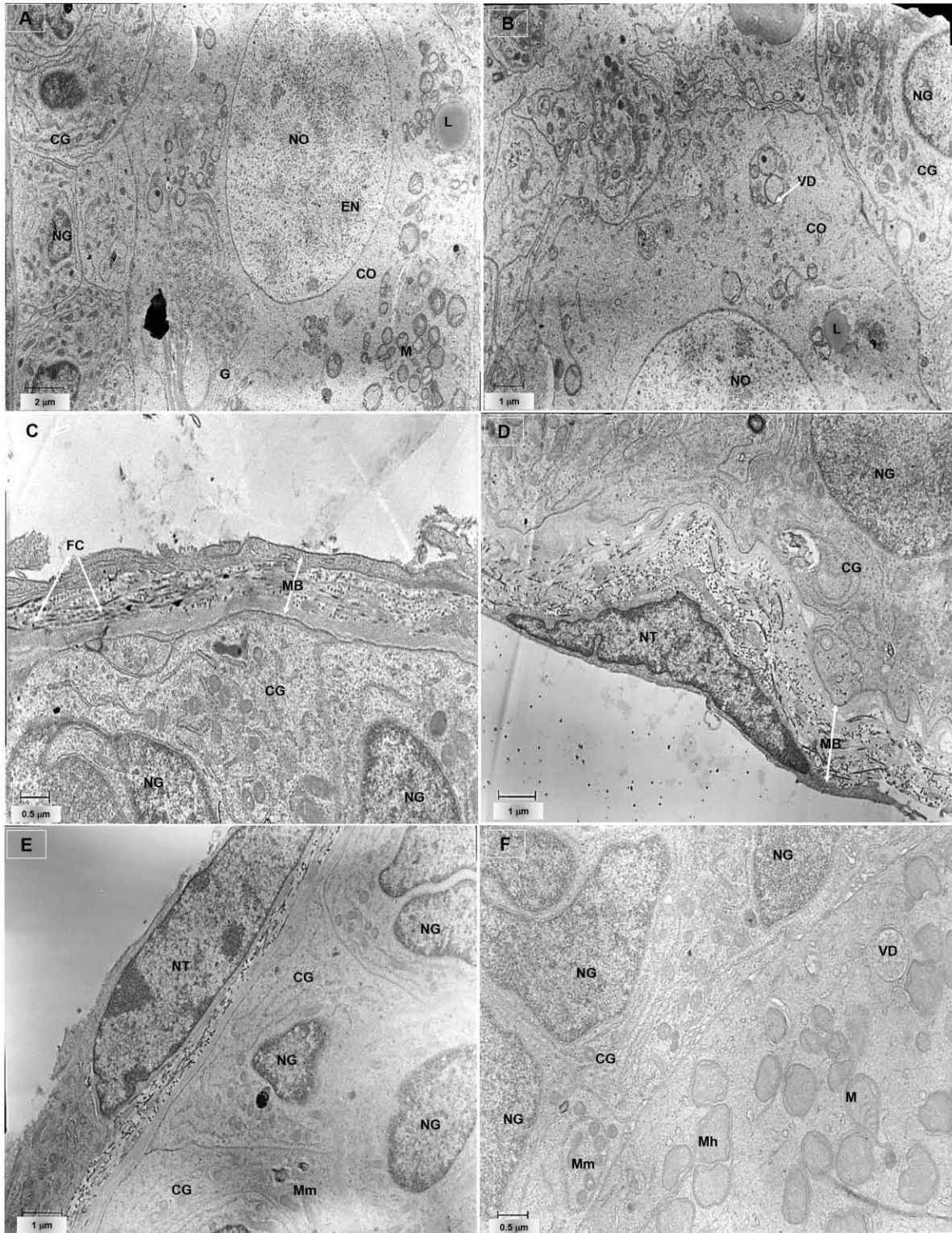


Figura 10. Ultra-estructura de folículos preantrales secundarios bovinos del grupo Control (No Criopreservado) calidad Buena. Los organelos y estructuras que se pueden apreciar son: Núcleo del ovocito (NO), citoplasma del ovocito (CO), núcleo de la célula de la granulosa (NG), citoplasma de la célula de la granulosa (CG), mitocondrias maduras con crestas (Mm), mitocondrias en proceso de maduración (M), mitocondrias hinchadas (Mh), envoltura nuclear (En), núcleo de la célula de la teca interna (NT), citoplasma

de la célula de la teca interna (CT), membrana basal del folículo (MB), fibras de colágeno (FC), aparato de Golgi (G), retículo endoplásmico (RE), gotas lipídicas (L), vesículas (V), vesículas de doble membrana secuestrando porción citoplásmica y/u organelos (VD).

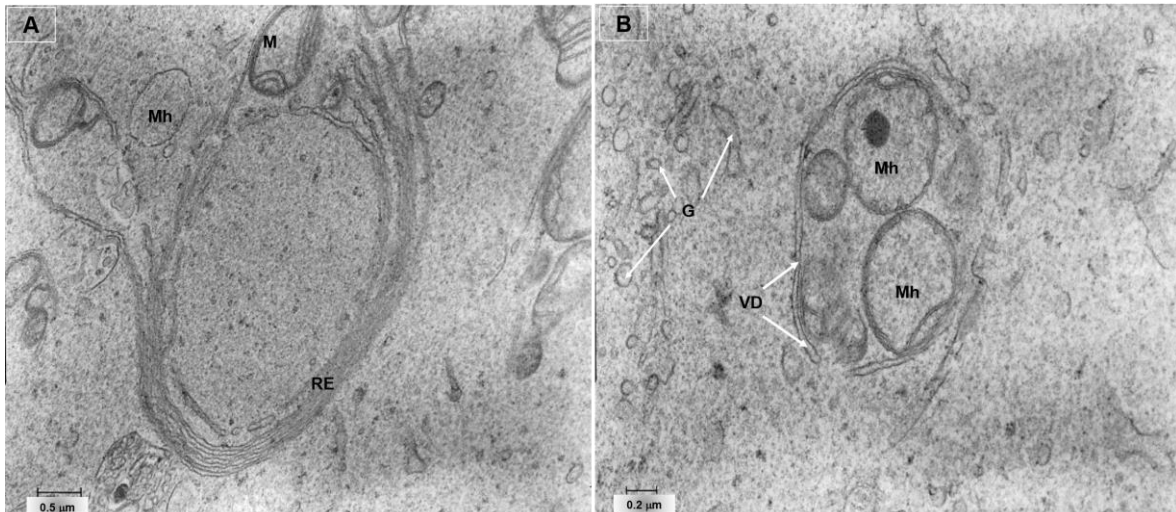


Figura 11. Proceso dinámico asociado a la presencia de grupos de dobles membranas, que sugiere un reciclaje de organelos a nivel del ovocito inmaduro de los folículos bovinos preantrales, mediado por el secuestro de organelos o parte del citoplasma (Autofagia). La presencia de retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias globulares o hinchadas (Mh) y en proceso de maduración (M) entrando en un proceso dinámico de reciclaje de organelos a nivel citoplásmico en el ovocito inmaduro (figura A). También se observó la presencia de cisternas de Golgi (G) próximas a una área vesicular de doble membrana (VD) que llevan a cabo el secuestro de mitocondrias globulares de diversos tamaños (figura B).

3.4.3.2 Folículos preantrales bovinos criopreservados.

En el presente análisis ultraestructural de los folículos preantrales bajo los tratamientos de preservación criogénica además de observar la conformación, distribución y morfología de organelos en las células que conforman a los folículos, también fue observado el proceso dinámico llamado autofagia, a continuación, se describe lo evaluado para cada tratamiento.

Los folículos preantrales criopreservados mediante el método de curva lenta bajo EG como agente crioprotector no mostraron daño significativo en la estructura general de sus células de la granulosa, puesto que durante su evaluación bajo el microscopio electrónico de transmisión se observó un promedio de tres células con alteración de membrana y envoltura nuclear por cada 27 analizadas (11.11%). Por consiguiente, los ovocitos correspondientes a estos folículos se mantuvieron con alteraciones poco perceptibles. Cabe señalar la presencia de fuertes uniones entre el complejo celular de la granulosa y el ovocito inmaduro conocidas como microvellosidades. Respecto al proceso dinámico de reciclaje (autofagia), éste se observó con frecuencia y fue similar al del grupo control con estructuras de doble membrana que contenían residuos de organelos secuestrados en su interior y que a su vez fue posible distinguir entre cierto grado temprano o avanzado en la degradación de los componentes internos de dicho proceso de reciclaje (Ver figura 12).

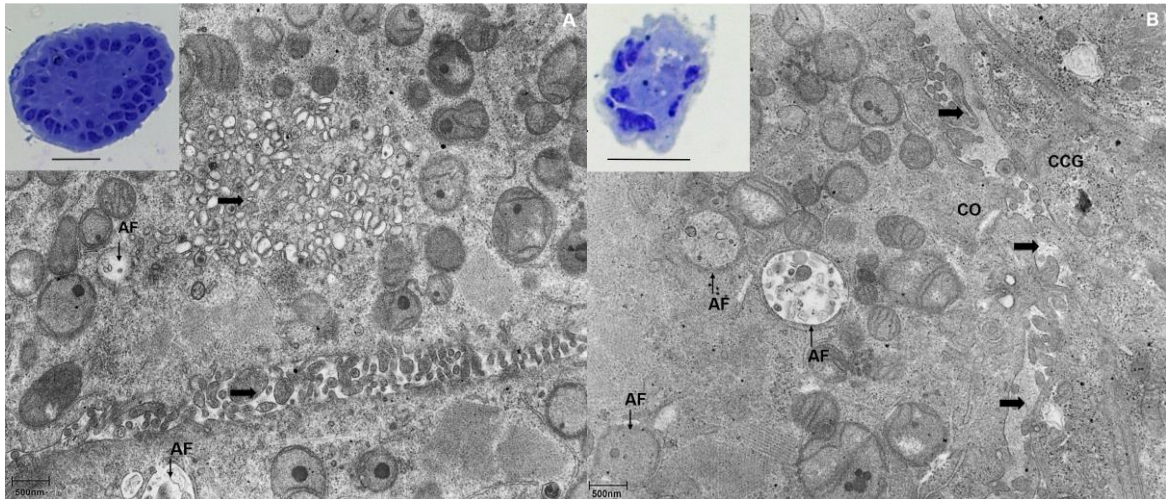


Figura 12. En la parte superior se muestran dos cortes semifinos (Barras = 20µm) de folículos preantrales criopreservados con EG como agente crioprotector. En lo particular, la ultraestructura en las figuras A y B proyectan la presencia de microvellosidades tanto longitudinales como transversales (flechas gruesas) que corresponden a una íntima comunicación entre células de la granulosa y el ovocito inmaduro, indispensables para continuar con el intercambio de factores de crecimiento, proteínas u otros metabolitos. Las microvellosidades, tanto del ovocito como de las células de la granulosa, están separados por el depósito del material que formará la zona pelúcida. Nótese también la gran cantidad de mitocondrias globulares en diversos estadios de inmadurez que corresponden al citoplasma del ovocito. Las flechas delgadas indican la presencia de autofagosomas (AF), estructuras que intervienen en el proceso activo de reciclaje de organelos caracterizado por la presencia de una doble membrana que contiene restos de organelos citoplásmicos secuestrados y es de forma circular. Citoplasma del ovocito (CO), Citoplasma de la célula de la granulosa (CCG).

A continuación, se detalla la ultraestructura de los folículos preantrales bajo criopreservación por el método de curva lenta utilizando DMSO como agente crioprotector. La membrana basal de los folículos se observó sin rupturas o alteraciones en su continuidad al igual que las fibras de colágeno presentes. Para las células de la granulosa al menos 5 de cada 10 de ellas presentaron alteraciones (50%) de membranas, organelos y de la envoltura nuclear con formación de alto contenido vesicular, lo cual indica daño irreversible por efecto del proceso durante la congelación/descongelación. Mientras tanto, en los ovocitos el daño a nivel membrana celular no se observó, inclusive en donde hubo uniones adherentes, se aprecia la continuidad de membrana del ovocito y restos de microvellosidades que posiblemente serán expulsadas o incluidas en vesículas. Este proceso de ruptura de microvellosidades y separación de uniones podría considerarse como un medio de defensa del ovocito inmaduro ante eventos que comprometan a ciertas células foliculares. Respecto a los organelos citoplásmicos no se presentaron patrones que indiquen diferencia en su distribución o estructura dentro del citoplasma. Sin embargo, es necesario resaltar que en los ovocitos inmaduros de folículos preantrales bajo éste tratamiento se hizo más notoria la presencia de procesos de reciclaje de organelos, pero mostrando ciertos niveles de avance en la degradación de su contenido. Por lo que se refiere al núcleo, éste presentó una doble envoltura, intacta en todas las observaciones, así como cromatina dispersa y un nucléolo excéntrico (Ver figura 13).

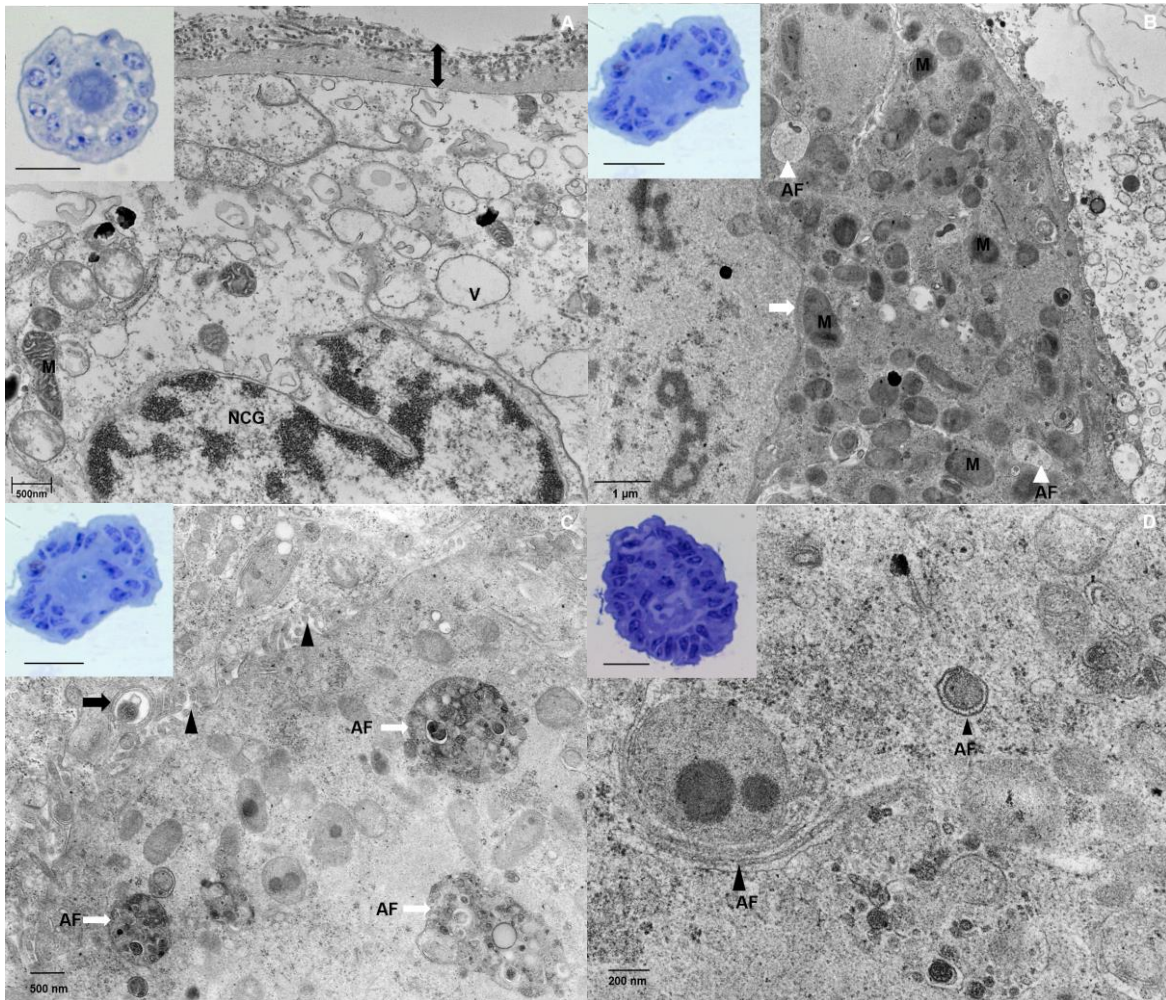


Figura 13. Detalle ultraestructural de folículos preantrales bajo criopreservación por el método de curva lenta con DMSO como agente crioprotector. En la parte superior izquierda de cada microfotografía se observan los cortes semifinos de los folículos preantrales (Barras = 20 μ m) de los cuales se extrajo cada una. En la figura A la flecha con doble punta indica el espesor de la membrana basal que se muestra intacta, sin embargo, también se observa formación de múltiples vesículas (V) citoplásmicas, así como el daño inminente que se causó a la envoltura del núcleo de la célula de la granulosa (NCG) del folículo preantral. En la figura B se aprecia un folículo preantral con daño localizado de sus células de la granulosa, sin embargo, el ovocito y sus organelos no muestran irregularidades aparentes. En él encontramos envoltura nuclear intacta (flecha gruesa), mitocondrias (M) y autofagosomas (AF), procesos dinámicos de reciclaje con residuos en su interior (puntas de flecha). La figura C representa al mismo folículo visto desde otro ángulo y encontramos una estrecha y fuerte unión del ovocito junto a las células de la granulosa (puntas de flecha), así también se hace más notoria la presencia de procesos de reciclaje de porciones de citoplasma con abundantes restos de organelos (flecha gruesa blanca). Estos procesos presentan esa doble membrana que los caracteriza (flecha gruesa negra), además es posible apreciar la formación de una cisterna que separa a estas membranas. Estos detalles también se observan en la figura D, pero se muestran como estados más tempranos de formación de dicho proceso, donde la doble membrana inicia el secuestro de mitocondrias globulares (punta de flecha).

Continuando con la descripción correspondiente a la ultraestructura de los folículos preantrales bajo criopreservación por el método de curva lenta con GLI como agente crioprotector, este fue semejante a la descripción previa, en cuanto a la preservación de la membrana basal y su continuidad alrededor del folículo inmaduro. En el caso de las células

de la granulosa, se vieron afectadas de 3 a 4 de cada diez (30-40%) observadas bajo el microscopio electrónico, sin embargo, la ruptura de membranas, organelos y formación de múltiples vesículas fue menos visible que en aquellos bajo el tratamiento DMSO, pero más frecuente que en los de EG. No se observaron daños relevantes a nivel del ovocito, estructuras u organelos que sigan patrones específicos. Nuevamente las observaciones relevantes se relacionan con abundantes mitocondrias redondeadas con presencia de gotas lipídicas en su interior y formación de procesos de secuestro de organelos por una doble membrana con o sin presencia de cisterna diferenciada que nuevamente da pauta para identificar un nivel de avance durante el proceso catabólico del contenido. En la figura 14 se representan dichos detalles.

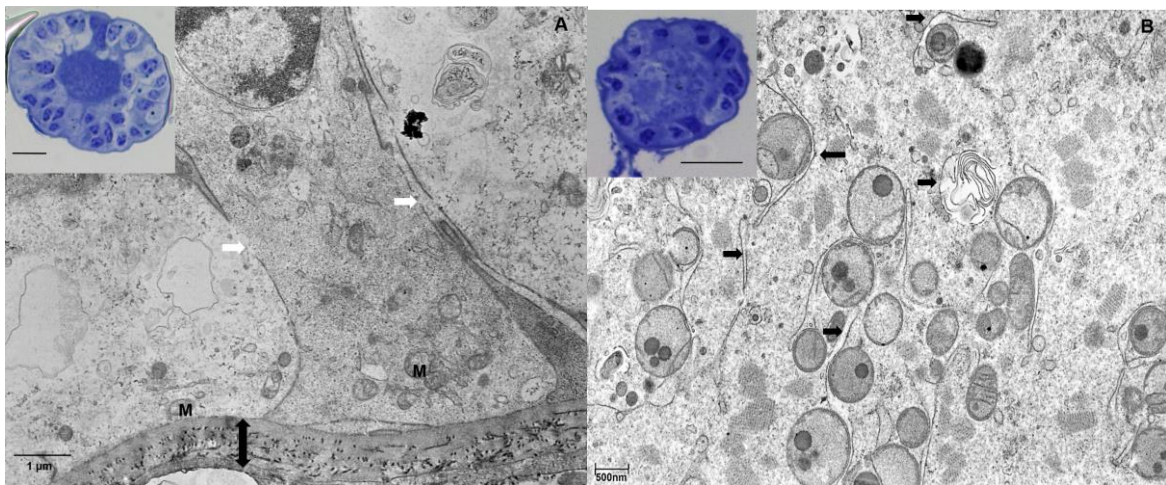


Figura 14. Ultraestructura de folículos preantrales bajo criopreservación por el método de curva lenta con GLI como agente crioprotector. En la parte superior izquierda de cada microfotografía se observan los cortes semifinos de los folículos preantrales (Barras = 20µm) de los cuales se extrajo cada una. Las flechas blancas gruesas en la figura A indican el daño parcial de las membranas de las células de la granulosa en consecuencia del proceso de congelación/descongelación con GLI como crioprotector, también se observan restos de citoplasma y organelos formando vesículas y es probable que se asocien con el desarrollo de procesos de reciclaje posteriores en las zonas afectadas de las células de la granulosa dañadas. En esta imagen resalta la presencia de mitocondrias (M) y membrana basal (flecha con doble punta) intactas. En la figura B, en efecto se observa la presencia sobresaliente de mitocondrias redondeadas con gotas lipídicas en su interior, y estrechamente asociadas a dobles membranas con cisterna, unas más visibles que otras. Es necesario subrayar que este proceso dinámico que se ha observado constantemente puede no ser detrimental para el folículo mismo, más bien sugiere un mecanismo de defensa ante un daño inminente que amenace la homeostasis folicular.

La siguiente descripción ultraestructural corresponde a los folículos preantrales bajo criopreservación por el método de vitrificación convencional (VC) previamente descrito. La integridad y continuidad de la membrana basal de los folículos bajo éste tratamiento es semejante a la de los del grupo control, considerando el uso de la mezcla de crioprotectores aplicados durante el proceso y no se observan alteraciones detrimentales. La integridad de las células de la granulosa fue elevada en los folículos analizados y sólo se observó un promedio de alteración máximo en 3 de cada 16 células por campo visualizado (18.75%). Estas alteraciones fueron: interrupción parcial de su membrana celular y formación de vesículas con restos de organelos. Por el contrario, todas las membranas de las células de la granulosa que se mantuvieron integra, guardaron una perfecta adherencia entre ellas y un

marcado desarrollo de microvellosidades al contactar con la membrana del ovocito inmaduro. Los organelos de las células de la granulosa integras, no se observaron diferentes a sus homólogas del grupo control. En los ovocitos inmaduros no se observó discrepancias respecto a la integridad de su membrana o en la distribución y morfología de organelos, incluyendo la conformación de su núcleo. Sin embargo, cabe resaltar que bajo éste tratamiento se observó una mayor presencia de dobles membranas libres y asociadas a las mitocondrias globulares hinchadas en comparación a los folículos de los tratamientos EG, DMSO y GLI. Otro rasgo interesante es la presencia de partículas libres en áreas determinadas del citoplasma semejantes al contenido de las vesículas con doble membrana bajo el esquema de reciclaje de organelos o autofagia en el ovocito inmaduro de folículos preantrales, del cual se ha hecho mención (Figura 15).

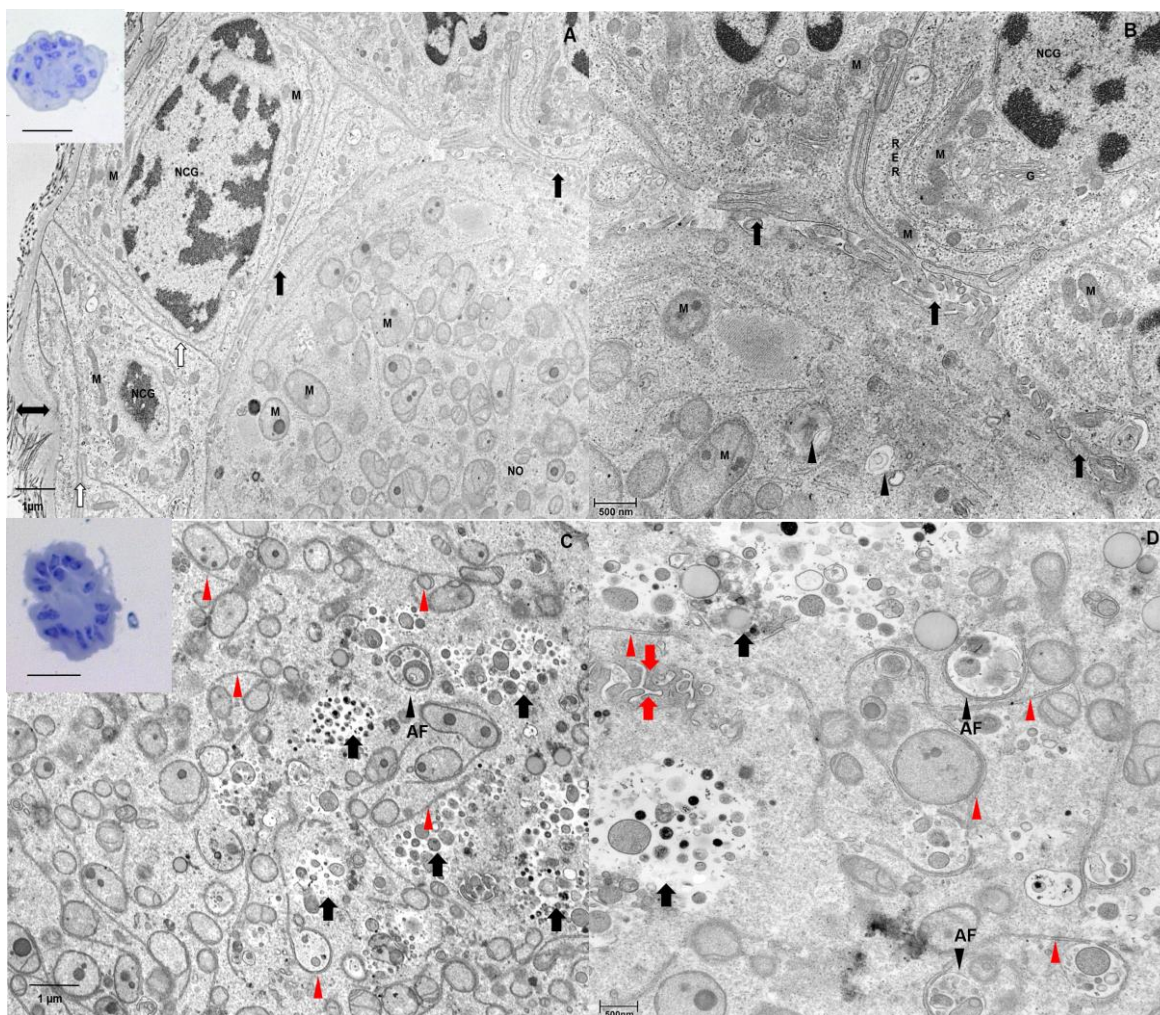


Figura 15. Ultraestructura de folículos preantrales bajo criopreservación por el método de vitrificación convencional (VC). En la parte superior izquierda de cada microfotografía se observan los cortes semifinos de los folículos preantrales (Barras = 20 μ m) de los cuales se extrajo cada una. Las figuras A y B corresponden al mismo folículo y en ellas se pueden apreciar la integridad de la membrana basal (flecha doble punta), membranas de las células de la granulosa (Flecha gruesa blanca), núcleo de la célula de la granulosa (NCG), mitocondrias (M), microvellosidades (Flecha gruesa negra), retículo endoplásmico rugoso (RER), así como pequeñas áreas circulares con doble membrana y contenido citoplásmico en su interior (puntas de flecha negras). Para las figuras C y D que corresponden al mismo folículo se ilustra la presencia de autofagosomas

(AF) en diferentes etapas de su actividad de reciclaje (puntas de flecha negra). La presencia de dobles membranas libres (puntas de flecha rojas) que rodean a mitocondrias globulares y que llevan a cabo el secuestro de dichos organelos. Cabe resaltar la existencia de partículas libres en determinadas áreas, semejantes a residuos en degradación, pero sin doble membrana que los contenga (flecha negra gruesa). Por último, las flechas gruesas rojas indican la presencia de microvellosidades intactas.

Prosiguiendo con nuestro análisis descriptivo ultraestructural compete por último a los folículos preantrales bajo criopreservación por el método de vitrificación directa en funda (VDF) ya descrito. Estos folículos preantrales presentaron integridad total de su membrana basal. Las células de la granulosa se observaron íntegras en su mayoría con un promedio máximo de 3 dañadas por cada 30 contabilizadas (10%). Estas escasas alteraciones fueron: interrupción parcial de la membrana celular y formación de vesículas con restos de organelos. En contraste, resalta en mayor cuantía la elevada preservación de uniones adherentes y por microvellosidades entre células, comparado con los folículos tratados en EG, DMSO, GLI y VC. El ovocito inmaduro y sus organelos no mostraron alteraciones estructurales con respecto a los del grupo Control. Cabe resaltar que la presencia de las dobles membranas libres y asociadas a mitocondrias globulares también fueron observadas, pero en menor grado que en el tratamiento VC, así como la presencia de ciertas partículas libres en áreas determinadas del citoplasma, semejantes al contenido de las estructuras redondeadas con doble membrana del ovocito inmaduro de folículos preantrales (Ver figura 16).

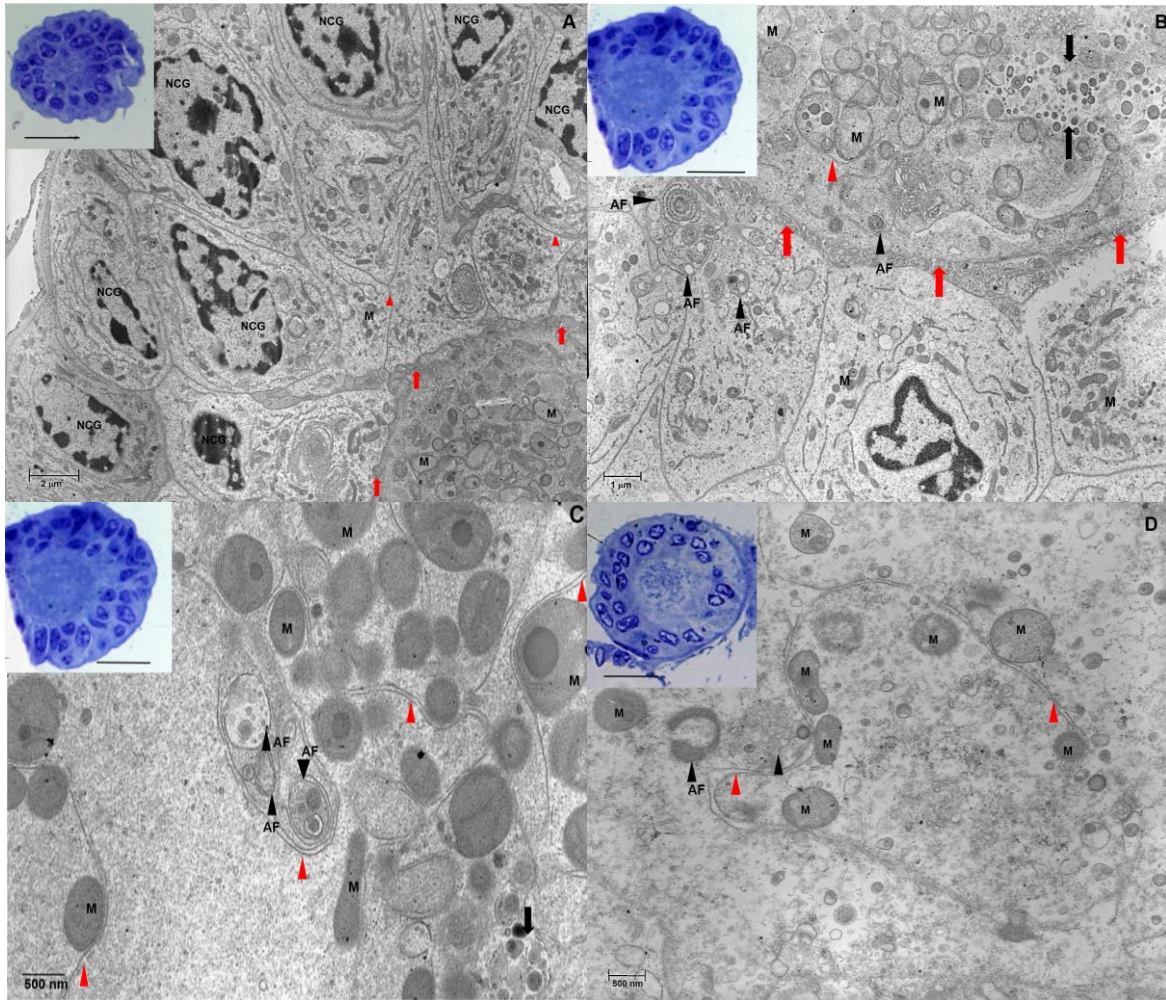


Figura 16. Ultraestructura de folículos preantrales bajo criopreservación por el método de vitrificación directo en funda (VDF). En la parte superior izquierda de cada microfotografía se observan los cortes semifinos de los folículos preantrales (Barras = 20 μ m) de los cuales se extrajo cada una. Las figuras A y B indican la elevada integridad y unión del complejo celular granulosa-ovocito inmaduro y de sus uniones comunicantes (flechas gruesas rojas). La riqueza de organelos (figuras C y D) caracteriza el citoplasma del ovocito y destacan principalmente las mitocondrias con forma globular y con presencia de gotas lipídicas en su interior. También se observan autofagosomas (AF), redondeados con doble membrana y contenido en su interior en diversos grados de degradación de sus componentes, de igual manera se aprecian dobles membranas asociándose a las mitocondrias globulares como un indicio de engolfamiento de organelos (autofagia). La presencia de partículas libres pre-digeridas similares a las contenidas en interior de las dobles membranas circulares se pueden observar ocasionalmente (flechas negras gruesas).

Los resultados obtenidos en las tres evaluaciones (morfología, viabilidad y ultraestructura) de los folículos de los grupos Control y criopreservados (EG, DMSO, GLI, VC y VDF) se resumen en la siguiente tabla que nos indica que el método de criopreservación que menos daño y alteraciones causó fue VDF.

Tabla 2. Asignación de tres puntajes basados en los resultados obtenidos durante la evaluación de la Morfología, Viabilidad y ultraestructura de folículos preantrales bovinos criopreservados o no, encaminados a la toma de decisión del método de criopreservación más eficiente.

Criterios de evaluación	Tratamientos					
	Control	EG	DMSO	GLI	VC	VDF
Morfología buena						
Primordial	+++	++	+	++	++	++
Primario	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Secundario	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Viabilidad						
Primordial	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Primario	+++	++	++	+	++	++
Secundario	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ultraestructura						
Membrana basal	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cels granulosa	+++	+++	++	++	++	+++
Ovocito	+++	++	++	++	++	+++

Puntaje de evaluación Bajo (+), Intermedio (++) y Alto (+++) basado en los análisis estadísticos e integridad ultraestructural de los folículos preantrales evaluados. A mayor puntaje mejor preservación folicular.

3.5 Discusión

La integridad y viabilidad de folículos preantrales bovinos fueron evaluadas después de criopreservar el TOC mediante los métodos de curva lenta utilizando diferentes agentes crioprotectores como Etilenglicol (EG), Dimetil Sulfoxido (DMSO) o Glicerol (GLI); o criopreservados mediante los métodos de vitrificación convencional (VC) o directo en funda (VDF).

Al exponer los folículos preantrales *in situ* o aislados de su corteza fue posible inducir una serie de modificaciones en su estructura y viabilidad. Los diferentes procesos de criopreservación, así como el calentamiento/descongelación también pudieron afectar la integridad y viabilidad folicular. Excepto cuando los procesos de intercambio de solutos entre las células o tejidos en sus soluciones crioprotectoras se llevaron a cabo adecuadamente, donde fue posible reducir los daños ocasionados por la toxicidad y efectos osmóticos en los folículos preantrales durante los procedimientos (Gook y Edgar, 2007; Arav, 2014).

En el presente trabajo sólo se observaron diferencias en el porcentaje de folículos morfológicamente Buenos para el estadio primordial entre tratamientos EG y DMSO, similar a lo reportado por Celestino *et al.* (2008), quienes al evaluar sobre TOC el efecto de la presencia o ausencia de dos concentraciones (1.5 y 3.0 M) de glicerol, etilenglicol, propanodiol y dimetil sulfóxido sometidos o no a previo enfriamiento en solución salina. Reportan un aumento a favor en los criopreservados con etilenglicol (77%) comparado con dimetil sulfóxido (67%) en TOC bovino.

En otro estudio, Tsuribe *et al.* (2009), reportaron que en el análisis histológico de folículos preantrales en TOC ovino previamente criopreservado en EG, DMSO o EG+DMSO a mismas concentraciones (1.5 M/L), hubo reducción significativa del porcentaje de folículos preantrales normales o de buena calidad en DMSO (37%) o EG+DMSO (33%) comparado con EG (44%). Similar a ellos, Borges *et al.* (2009), indicaron una mayor eficiencia del EG (81.8%) con respecto al DMSO (67.0%) y GLI (0%) en el análisis histológico de la morfología folicular preantral en cerdos, bajo diversos procesos de criopreservación. Estos resultados de elevada eficiencia del EG en la preservación de la morfología folicular se han asociado al bajo peso molecular del EG comparado con el DMSO y GLI, lo que le facilita su rápida difusión y reducción del posible daño osmótico en el tejido ovárico y los folículos preantrales.

Con base a lo antes mencionado, nuestros resultados se suman en indicar que el EG, DMSO y GLI como agentes crioprotectores permeables de las membranas foliculares, demuestran brindar un elevado efecto de protección hacia los organelos intracelulares durante los procesos de enfriamiento rápido o controlado, mediante la reducción de la formación de cristales de hielo intra y extrafolicular (Donnez *et al.*, 2006 b; Santos *et al.*, 2007 b).

Con respecto a las alteraciones causadas en folículos en esta investigación, clasificados como calidad Regular, se identificó principalmente una desorganización y/o desprendimiento parcial o completo de las células de la granulosa con su ovocito. Este tipo

de alteración puede estar sujeto al tipo de crioprotector utilizado, ya que de acuerdo a nuestros resultados los folículos permanecen con menor número de alteraciones cuando se criopreservan con EG que cuando se congelan en DMSO. Estas alteraciones coinciden con lo observado por Faustino *et al.* (2010), en tejido cortical ovárico ovino y caprino, no obstante en nuestro análisis no se apreció reducción de la densidad de las células del estroma como lo reportan estos autores. Si bien es cierto, la evaluación de la integridad morfológica con base a cortes histológicos es evidencia importante del posible daño macroscópico, sin embargo el uso de tinciones vitales (tripan azul; Courbiere *et al.*, 2005; Fauque *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007 b) y la evaluación ultra-estructural para evidenciar a trasfondo el posible daño y su nivel de avance en los folículos clasificados macroscópicamente como Buenos (Ortiz *et al.*, 2006; Sadeu *et al.*, 2006;), fueron las herramientas que nos permitieron de forma más precisa y simultánea evaluar la eficacia de los métodos de criopreservación en esta investigación.

El aislamiento mecánico y enzimático de los folículos provenientes de tejido cortical ovárico previamente criopreservado y Control se llevó a cabo exitosamente, y la viabilidad folicular fue analizada (Fauque *et al.*, 2007; Filipiak y Larocca, 2012). La evaluación microscópica de los folículos aislados no indicó diferencia en el promedio de folículos viables entre tratamientos luego de su tinción con tripan azul desde un punto de vista citológico y morfológico previo al enfriamiento o después de la descongelación/calentamiento de los folículos aislados del tejido ovárico cortical, criopreservado o no. El uso de la tinción supra vital con tripan azul para diferenciar células vivas y muertas fue descrito en diversas investigaciones (Jewgenow and Göritz, 1995; Saha *et al.*, 2000; Courbiere *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007 b) con resultados satisfactorios, sobre todo en situaciones relacionadas con los cambios de temperatura dados durante y después de la criopreservación que tienden a reducir el número de folículos viables.

El estudio de microscopia electrónica de transmisión confirmó la integridad ultraestructural de los folículos aislados no teñidos, procedentes de corteza ovárica bovina criopreservada o no. Durante la evaluación y descripción sus células de la granulosa normales, en general, fueron similares a aquellas descritas por otros autores (Ortiz *et al.*, 2006; Nottola *et al.*, 2008; Cisneros *et al.*, 2017), los cuales indicaron principalmente la ausencia de patrones de distribución de los organelos citoplásmicos, presencia de núcleos pleomórficos y escasas gotas lipídicas en citoplasma. Al realizar el análisis de ultraestructura de las células de la granulosa con posibles daños, determinamos que en los folículos bajo los tratamientos EG y VDF se mostró el menor número y porcentaje de daño, y fueron las que más se asimilaron a las del grupo Control (3/27 y 11.11%; 3/30 y 10%; 1/35 y 2.85%), respectivamente. Estos resultados fueron similares con los descritos por Keros *et al.* (2009), al evaluar las características morfológicas ultra-estructurales de las células de la granulosa de folículos inmaduros en mujeres, donde el número de células de la granulosa integra y morfológicamente normales fue mayor después de usar únicamente EG o EG+DMSO para el método de enfriamiento controlado o vitrificación, respectivamente.

Los efectos criogénicos adversos ultraestructurales en los ovocitos de los folículos evaluados fueron escasos. En la mayoría de los ovocitos los organelos más abundantes fueron las mitocondrias con formas redondeadas o hinchadas y se consideran formas

inmaduras de éste organelo, las cuales desarrollan a su forma elongada conforme se alcanza la madurez del ovocito. La presencia de mitocondrias inmaduras puede ser consistente con los folículos inmaduros que contienen ovocitos quiescentes que no requieren grandes cantidades de energía para sobrevivir (Paulini *et al.*, 2014). El secuestro de mitocondrias simple o asociado con retículo endoplásmico fue descrito en nuestras observaciones para todos los ovocitos de folículos criopreservados y no tratados (Control). La autofagia se ha descrito como un proceso mediante el cual una porción del citoplasma, que puede o no incluir organelos es secuestrado por una doble membrana vesicular llamada autofagosoma y forma parte de los mecanismos reguladores en la determinación de alteraciones bioquímicas y morfológicas de la célula junto con la apoptosis (Klionsky *et al.*, 2011). Sin embargo, en mamíferos la autofagia puede considerarse como un evento constitutivo que interviene en la regulación del crecimiento celular, diferenciación y homeostasis a diferencia de la apoptosis que es un proceso encaminado a la muerte celular programada (Ortiz *et al.*, 2006).

Se ha reportado presencia del proceso de autofagia en células epiteliales de la glándula mamaria bovina bajo remodelación intensiva durante el ciclo de lactación y su disminución durante el periodo seco, tanto a nivel *in vivo* como *in vitro*. En donde éste proceso autofágico es considerado como un mecanismo de estabilización intracelular que supe de energía y aminoácidos conforme se alcanza la involución regenerativa de la glándula en la hembra bovina (Motyl *et al.*, 2007). En otro estudio realizado por Ortiz *et al.* (2006), fue reportada la presencia de autofagosomas tanto en ovocitos de folículos preantrales en crecimiento y atrésicos de ratas prepúberes, y describen claramente la diferencia entre vacuolas apoptóticas y vesículas autofágicas presentes en los mismos. Ellos concluyen que ambos procesos están asociados en la reducción atrésica fisiológica de la población folicular en ratas entre el nacimiento y la pubertad, y el mecanismo bioquímico por el cual se active uno u otro se asocia a la expresión de proteínas que participan en el inicio de ambos procesos.

Con base a la información previa podemos considerar que la presencia de autofagosomas en los ovocitos inmaduros bovinos de esta investigación indica que existe una dinámica de reciclaje de organelos muy marcada a este nivel, con el posible objeto de mantener y asegurar la viabilidad de dichas células en el tejido cortical ovárico hasta el momento de su reclutamiento y reanudación de la meiosis. Momento en el cual las mitocondrias deberán ser funcionales y proporcionar al ovocito la cantidad de energía suficiente para culminar la siguiente división meiótica y alcanzar la madurez o atresia (Kuma y Mizushima, 2010).

Dado que la posible formación de hielo intracelular durante y después de los procesos de criopreservación es universalmente aceptada como un inductor de estrés celular que tiende a inducir daño irreversible y pueda conducir a la muerte a células y tejidos (Elliott *et al.*, 2017), no existe información relacionada con que este proceso pueda causar inducción, aumento o alteración de la de actividad autofágica en folículos inmaduros presentes en TOC bovino. Con base en el análisis de imágenes de esta investigación es posible decir que la incidencia de autofagia si se incrementa en los ovocitos de folículos tratados con DMSO y GLI, con respecto a EG. Mientras tanto que la incidencia de autofagia en ovocitos de los grupos EG y VDF, fue similar a la observada en el grupo control, la cual se considera estable o basal, para ésta investigación.

Por otra parte, es altamente probable que la presencia de partículas libres en el citoplasma de los ovocitos de folículos inmaduros, en los tratamientos VC y VDF, semejantes al contenido de los autofagosomas, se encuentre asociada a la ruptura de sus dobles membranas durante el proceso de vitrificación/calentamiento y su presencia en abundancia indica una posible re-estructuración de las mismas con la finalidad de incorporar nuevamente el contenido a su interior para continuar con dicho proceso catabólico y así reparar el posible daño o regular la homeostasis del ovocito, permitiéndole mantener su viabilidad, tal y como se observó en nuestros resultados. No obstante es necesario realizar más pruebas que evalúen además de la presencia de autofagia en ovocitos de folículos preantrales provenientes de TOC, si su inducción, aumento o alteración son afectadas luego de llevar a cabo la criopreservación por curva lenta o vitrificación mediante pruebas de cultivo celular, inmunohistoquímica y ultraestructura en la especie bovina.

3.6 Conclusiones

Bajo nuestras condiciones de trabajo el método de vitrificación directa en funda (VDF) fue el que mejor preservó a nivel ultraestructural los ovocitos de folículos preantrales bovinos. Los ovocitos de folículos preantrales presentes en corteza ovárica previamente criopreservada o no están sujetos a un proceso dinámico de remodelación constante llamado autofagia.

4.0 CAPITULO 4

Efecto del cultivo *in vitro* en la sobrevivencia de folículos preantrales bovinos previamente criopreservados mediante curva lenta y vitrificación.

Efecto del cultivo *in vitro* en la sobrevivencia de folículos preantrales bovinos previamente criopreservados mediante curva lenta y vitrificación.

4.1 INTRODUCCIÓN

El ovario bovino contiene un número finito de folículos al nacimiento y conforme alcanza la pubertad esta población tiende a reducirse considerablemente. La mayoría de estos folículos permanecen en un estado quiescente, aguardando a su reclutamiento. El cultivo de folículos preantrales presentes en tejido ovárico cortical (TOC) o aislados, representa un reto al imitar el entorno ovárico, su dinámica de comunicación intercelular y la interacción con factores secretorios, hormonales y de crecimiento. Los sistemas de cultivo deben favorecer el mantenimiento de la arquitectura celular y tisular y han sido utilizados para el cultivo exitoso de folículos en varios modelos animales e inclusive existen reportes de individuos nacidos vivos resultantes del cultivo *in vitro* en múltiples especies como murinos (O'Brien *et al.*, 2003), porcinos (Wu *et al.*, 2001) y ovinos (Arunakumari *et al.*, 2010).

Aunque el medio de cultivo contiene una mezcla balanceada de sales de iones inorgánicos, aminoácidos, azúcares, vitaminas, enzimas, elementos traza y factores esenciales de crecimiento que permiten crear un ambiente físico basal para células o tejidos, este puede no ser siempre el apropiado (Palasz *et al.*, 2000). Por tanto, la adición de ciertos elementos que en investigaciones previas se ha demostrado que favorecen en el mantenimiento, desarrollo, diferenciación o maduración de folículos preantrales *in situ* o aislados del TOC son adicionados (Saha *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2009; Passos *et al.*, 2013). Sin embargo, también es posible que no todos estos elementos sean necesarios, o su concentración no sea la adecuada entre especies.

El aislamiento y cultivo de folículos preantrales *in vitro*, provenientes de TOC previamente criopreservado, es considerada la técnica de elección para conseguir ovocitos maduros, posicionando así a la criopreservación de TOC como una herramienta tecnológica capaz de preservar la fertilidad de las hembras de diferentes especies (Choi *et al.*, 2007). Sin embargo, la producción de ovocitos maduros *in vitro* con éxito significativo se ha notificado principalmente en el modelo murino luego de 10 a 12 días de cultivo (Hasegawa *et al.*, 2004).

Con base a la incertidumbre que se tiene del efecto de cultivo de folículos preantrales provenientes de TOC bovino criopreservado, esta investigación tuvo como objetivo evaluar únicamente el efecto del cultivo en la sobrevivencia e integridad de folículos aislados de TOC bovino descongelado/calentado.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Preparación de muestras

Se recolectaron 20 ovarios de diferentes cruces de hembras bovinas (*Bos taurus* x *B. indicus*) de 3-5 años de edad que mostraron signos de ciclicidad ovárica por la presencia de cuerpo lúteo y provenientes de pastoreo) inmediato a su sacrificio en un rastro local. Los ovarios fueron lavados dos veces seguidas con solución salina bufferada con fosfatos (PBS; Bioniche LSI, USA), y se colocaron en medio de transporte a base de PBS + 0.05% de sulfato de gentamicina (Gentalex fuerte, PISA, MX; Cisneros *et al.*, 2017), y se trasladaron en un tiempo aproximado de 1-3 h al laboratorio. De inmediato, cada ovario fue seccionado para obtener al menos 6 piezas (~2 mm X ~1 mm X 1 cm) de TOC con ayuda de pinzas de disección y hoja de bisturí (núm. 12). El TOC fue asignado aleatoriamente a 6 tratamientos (n=36 por tratamiento): No criopreservado (Control), criopreservado mediante el método de curva lenta con 3 diferentes agentes crioprotectores como Etilenglicol (EG), Dimetil Sulfóxido (DMSO) o Glicerol (GLI), y criopreservados mediante los métodos de vitrificación convencional (VC) y vitrificación directo en funda (VDF).

4.2.2 Criopreservación de TOC bovino mediante curva lenta y descongelación

El efecto de tres diferentes agentes crioprotectores fueron comparados para el método de curva lenta: Glicerol al 10% (GLI; Sigma-Aldrich, USA), Dimetil sulfóxido 1.5 M (DMSO; Sigma-Aldrich, USA), Etilenglicol 1.5 M (EG; Sigma-Aldrich, USA). Todas las soluciones crioprotectoras se prepararon en el medio base buffer fosfato salino de Dulbecco's (DPBS, Gibco, USA) más Sucrosa 0.4 M (Sigma-Aldrich, USA). Cada muestra fue colocada en viales criogénicos de 1.8 ml (Corning, USA), con 1 ml de solución crioprotectora, fue incubado a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se congelaron utilizando una cámara criogénica programable (Freeze control, CL 5500, AUS). Los crioviales fueron equilibraron a 20°C por 20 min, después la tasa de enfriamiento fue de 5°C/min, hasta alcanzar los -7°C y permanecer así por 10 min. Momento en el que se indujo la formación de cristales de hielo (seeding) manualmente mediante el contacto directo de los crioviales con pinzas hemostáticas pre-enfriadas en nitrógeno líquido (N₂L). El descenso de temperatura fue realizado a una velocidad de 0.3°C/min hasta alcanzar los -33 °C. Los crioviales fueron almacenados en N₂L, hasta el siguiente procedimiento (Lucci *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004). Los tejidos fueron descongelados al exponer los crioviales en aire (temperatura ambiente) por 30s, seguido por la inmersión en agua a 38°C, fueron agitados constantemente hasta alcanzar el derretimiento del hielo. El crioprotector fue removido lavando las muestras de tejido en tres pasos (cinco min en cada uno); dos de ellos en DPBS mas 0.4 M de Sucrosa y el respectivo crioprotector en concentraciones decrecientes (0.5 y 0.25% respecto a la concentración usada durante la congelación), y uno únicamente en DPBS (Borges *et al.*, 2009).

4.2.3 Criopreservación de TOC bovinomediante vitrificación y calentamiento

4.2.3.1 Vitrificación convencional (VC)

El medio base que se utilizó fue DPBS más 20% de sustituto sintético de suero (SSS; Irvine Scientific, USA). Los tejidos fueron deshidratados en una secuencia de dos pasos: a) 10% de EG + 10% de DMSO en medio base por 15 min; b) 20% DMSO + 20% de EG + Sucrosa 0.5 M en medio base por 5 min. Al finalizar, cada tejido fue transferido con pipeta Pasteur y lentamente fue liberado directo al recipiente con N₂L. Al solidificarse fue colectado con pinzas de disección pre-enfriadas, fue colocado en crioviales y se almacenó en un termo con N₂L hasta su posterior uso. Este procedimiento fue basado en la metodología descrita por Isachenko *et al.* (2003) y Zhou *et al.* (2010), diseñados para TOC en ratones.

4.2.3.2 Vitrificación directa en funda (VDF)

El medio base fue DPBS + 20% SSS. Los crioprotectores fueron utilizados en la siguiente concentración. Solución de equilibrio: 7.5% DMSO + 7.5% EG en medio base. Solución de vitrificación: 15% DMSO + 15%EG + Sucrosa 0.5 M en medio base. El TOC se colocó por 10 min en la solución de equilibrio a temperatura ambiente y por 2 min en la solución de vitrificación. Seguido a esto, se mantuvo sobre gaza estéril para absorber los residuos de la solución de vitrificación de forma rápida. Posteriormente el tejido se depositó en crioviales de 1.8 ml y el N₂L fue directamente aplicado sobre el TOC para su vitrificación. Los crioviales se almacenaron en un termo con N₂L hasta su posterior uso. Este proceso fue basado en la metodología descrita por Chen *et al.* (2006), para TOC humano.

El calentamiento de los tejidos vitrificados, se realizó al extraer con pinzas las solapas de corteza ovárica almacenadas en los crioviales inmersos en N₂L. De inmediato el TOC fue transferido secuencialmente en medio de calentamiento (TS: Sucrosa 1 M), seguido por tres medios de dilución (DS1, DS2 y DS3) que contenían Sucrosa a concentraciones decrecientes (0.5, 0.25 y 0.125 M) por 5 min en cada dilución. Por último todo el tejido vitrificado/calentado se mantuvo en un medio de lavado (WS), que fue únicamente medio base, en donde se mantuvieron hasta el siguiente proceso.

4.2.4 Aislamiento y evaluación de la viabilidad con azul tripan

Las piezas de TOC bovino por tratamiento (n=20) fueron disgregadas mecánicamente mediante deslices con hoja de bisturí hasta desgastar el tejido en su totalidad e inducir la liberación de los folículos preantrales en cajas de Petri con 10 ml de medio comercial Human Tubal Fluid (HTF modificado[®]; Irvine Scientific, USA) + 20% de SSS. Éste proceso fue una modificación hecha de la metodología reportada por Katska y Rynska (1998), y con base en la elevada heterogeneidad de la distribución folicular preantral del TOC (Hayashi *et al.*, 2015), fue necesario inducir una digestión parcial del tejido restante de cada muestra, con la finalidad de disgregar los restos y permitir la mayor liberación de folículos preantrales presentes. Los restos de TOC se colocaron en tubos de centrifuga y por cada ml de HTF modificado se agregaron 200 UI / ml de colagenasa tipo1 (Sigma-Aldrich, USA; Roy and Greenwald, 1985), el cual se mantuvo en incubación por 2 h a una atmósfera con un 6% de CO₂ a 38.5°C, seguido a ello el tejido se dispersó mecánicamente con ayuda de un vórtex y pipeta Pasteur por 30 min, la digestión fue inhibida mediante la adición de 4 ml de medio HTF modificado, posteriormente se centrifugó a 400 g por 15

min, el pellet resultante se reconstituyó en 100 µl de medio HTF modificado y se adicionaron 40 µl de Tripan azul al 4% (Sigma-Aldrich, USA) para su tinción, por último los folículos preantrales se aislaron y evaluaron bajo un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse TS100, Japan). Los folículos viables fueron considerados todos aquellos que no aceptaron la tinción y los teñidos fueron considerados no viables, con base en la metodología y resultados reportados por Fauque *et al.* (2007) y Filipiak y Larocca (2012), sobre la eficiencia de la tinción con tripan azul en la evaluación de la viabilidad en tejido criopreservado y sobre la diferenciación de ovocitos vivos y muertos en bovinos, respectivamente.

4.2.5 Cultivo *in vitro* de folículos preantrales bovinos procedentes de TOC fresco y descongelado/calentado.

Una vez aislados los folículos viables se colocaron en gotas de medio de cultivo enriquecido y cubiertas de aceite mineral (Sigma-Aldrich, USA) en cajas de Petri desechables (15 x 35 mm, Falcón, USA). El medio de cultivo base Waymouth MB752® (Gibco, USA), fue suplementado con 100 mUI/ml de FSH (Folltropin®-V, Bioniche, USA), 5µl/ml de insulina, 5µl/ml de transferrina y 5ng/ml de selenio (ITS, Sigma-Aldrich, USA), 75 µg/ml sulfato de estreptomina, 75µg/ml de penicilina G, 0.23 mM de ácido pirúvico, 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina y 100µM/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, USA; Saha *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2009; Passos *et al.*, 2013). Los folículos preantrales de cada tratamiento se cultivaron *in vitro* (CIV) por 8 y 16 días a 38.5°C y 6% de CO₂ en aire. El medio de cultivo fue sustituido cada 48 h por medio fresco con al menos 6 h de incubación previa. La viabilidad folicular fue evaluada con la tinción azul tripan y los folículos se observaron bajo un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse TS100, Japan). La integridad de los folículos preantrales los días 8 y 16 de cultivo se analizaron mediante microscopia electrónica de transmisión (MET). Los folículos se evaluaron de acuerdo a sus aspectos morfológicos generales (integridad de la membrana basal, compactación e integridad de las células de la granulosa y del ovocito).

4.2.6 Ultraestructura de folículos preantrales bovinos cultivados *in vitro*

Los folículos previamente cultivados fueron procesados para ser analizados por microscopia electrónica de transmisión (MET) mediante el siguiente procedimiento y determinar el efecto del cultivo a nivel ultraestructural (Merchant-Larios *et al.*, 1993; Cisneros *et al.*, 2017). Los folículos preantrales se fijaron en líquido de Karnovsky (paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2.5% en buffer cacodilato de sodio al 0.1 M y pH 7.3) por 24 h a 4°C. Después de la fijación, se lavaron en buffer cacodilato de sodio 0.1 M. La postfijación fue hecha en tetróxido de osmio al 1% en buffer Zelterqvst por una hora. Subsecuentemente, las muestras se deshidrataron en dosis graduales de alcohol etílico (50, 70, 80, 90 y 100%) por 15 min en cada uno (c/u), después en acetoneitrilo (dos cambios por 20 min c/u), seguido a ello fueron embebidos en proporciones 1:1 y 2:1 en resina EPON 812: acetoneitrilo por 1 h en c/u y por último fueron embebidos únicamente en resina EPON 812 por 24h. Los cortes semifinos (1-2 µm) se tiñeron en azul de toluidina. Los cortes finos

(60-70 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron bajo un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 100C.

4.2.7 Análisis estadístico Experimental

Se describen las principales alteraciones observadas en la ultra-estructura, puesto que no fue posible obtener un elevado número de folículos íntegros y contables en los días 8 y 16 de cultivo *in vitro* entre tratamientos.

4.3 RESULTADOS

Se aisló un total de 700 folículos preantrales de los TOCs Control y criopreservados, de los cuales 543 (77.57%) fueron clasificados como viables al momento del aislamiento y seleccionados para cultivo *in vitro* (n=90 por cada tratamiento), con base al protocolo previamente descrito, por un periodo de 8 y 16 días (Figura 17). Al evaluar al día 8 de cultivo la viabilidad de los folículos preantrales, su número en promedio se redujo de forma drástica a sólo 40 folículos preantrales por tratamiento, de los cuales 15 fueron procesados para MET y el resto continuaron en cultivo hasta el día 16, momento en el cual todos fueron procesados para MET. Durante todo el periodo de cultivo la temperatura (38.5°), humedad (95-100%) y concentración de CO₂ (6%) fueron monitoreados y no hubo variación dentro de la incubadora.

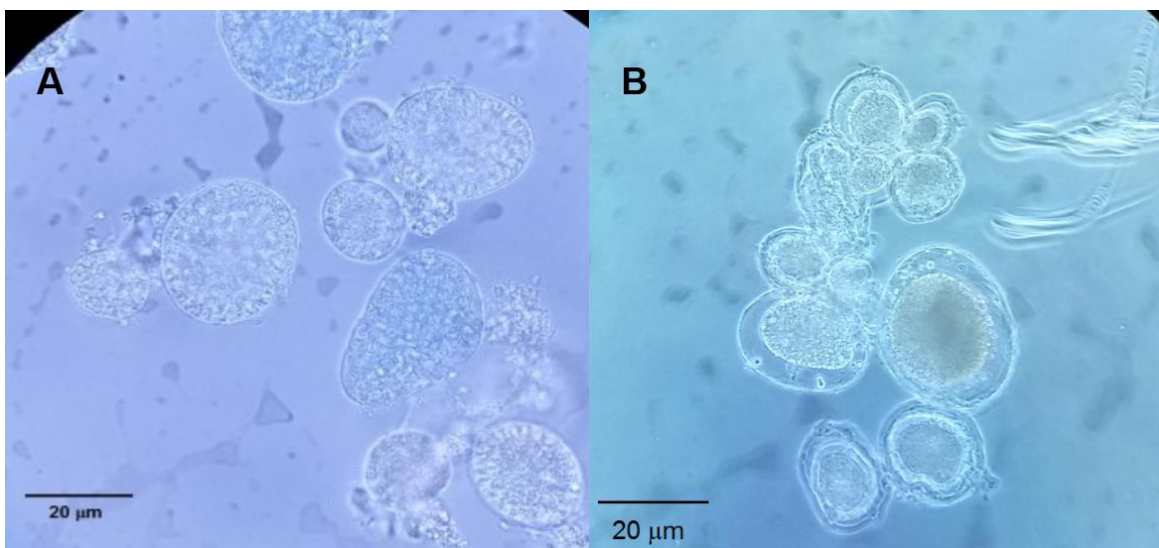


Figura 17. Folículos preantrales aislados cultivados *in vitro* por 8 (A) y 16 (B) días, vistos bajo microscopio de contraste de fases invertido (Magnificencia de ocular 40X).

La evaluación estructural en cortes semi-finos reveló que los folículos preantrales bovinos en los días 8 y 16 de cultivo *in vitro* que estuvieron bajo un tratamiento de criopreservación previamente (EG, DMSO, GLI, VC y VDF), habían perdido su capacidad

de competencia requerida para sobrevivir al proceso de cultivo. En los cortes semi-finos de folículos del grupo control sin previa criopreservación, fue posible observar únicamente a 2 folículos preantrales sin daño aparente y estructuralmente íntegros, correspondientes al día 8 de cultivo, mientras que para los de 16 días de cultivo, todos degeneraron (Figura 18).

La ultra-estructura de estos dos folículos Control confirmó su integridad únicamente para los evaluados al día 8 de cultivo. Nótese en el ovocito la presencia de dos nucléolos excéntricos. Un núcleo con su doble envoltura bien definida, su cromatina fue laxa, sin indicios de condensación específica que marquen un posible inicio de fragmentación y posteriormente la entrada a apoptosis (Fig. 19 A). En el citoplasma, de las células de la granulosa y del ovocito, la presencia de autofagosomas y lisosomas fue visible, lo que sugiere una activación metabólica durante el cultivo por parte del folículo como un proceso de sobrevivencia, que pudo permitirle adaptarse y seguir viviendo bajo las condiciones dadas (Fig. 19 B). La presencia de mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, y ribosomas fue similar a los folículos no cultivados y previamente descritos en esta investigación.

En las observaciones hechas en los folículos bajo los tratamientos de criopreservación, sobresale únicamente la presencia de residuos de células de la granulosa y ovocitos. Sin embargo, la membrana basal, fue la única estructura que permaneció visible y con escasas modificaciones, ya que generalmente se mostró una fuerte cohesión de sus fibras (Fig. 19 D). Cabe mencionar, que la razón por la cual estos folículos no se impregnaron del colorante vitalicio, durante su evaluación previa al cultivo, esté relacionada al efecto semi-permeable que le confiere el colágeno y la laminina a la membrana basal. Además, el grosor de la membrana basal de cada folículo cultivado, en general se vio aumentado en tres o cuatro veces más de lo común. También cabe señalar que los folículos disgregados y colocados en cultivo siempre tendieron a aglutinarse unos con otros. A nivel ultraestructural las membranas de estos folículos se mostraron fusionadas entre sí (Fig. 19 C).

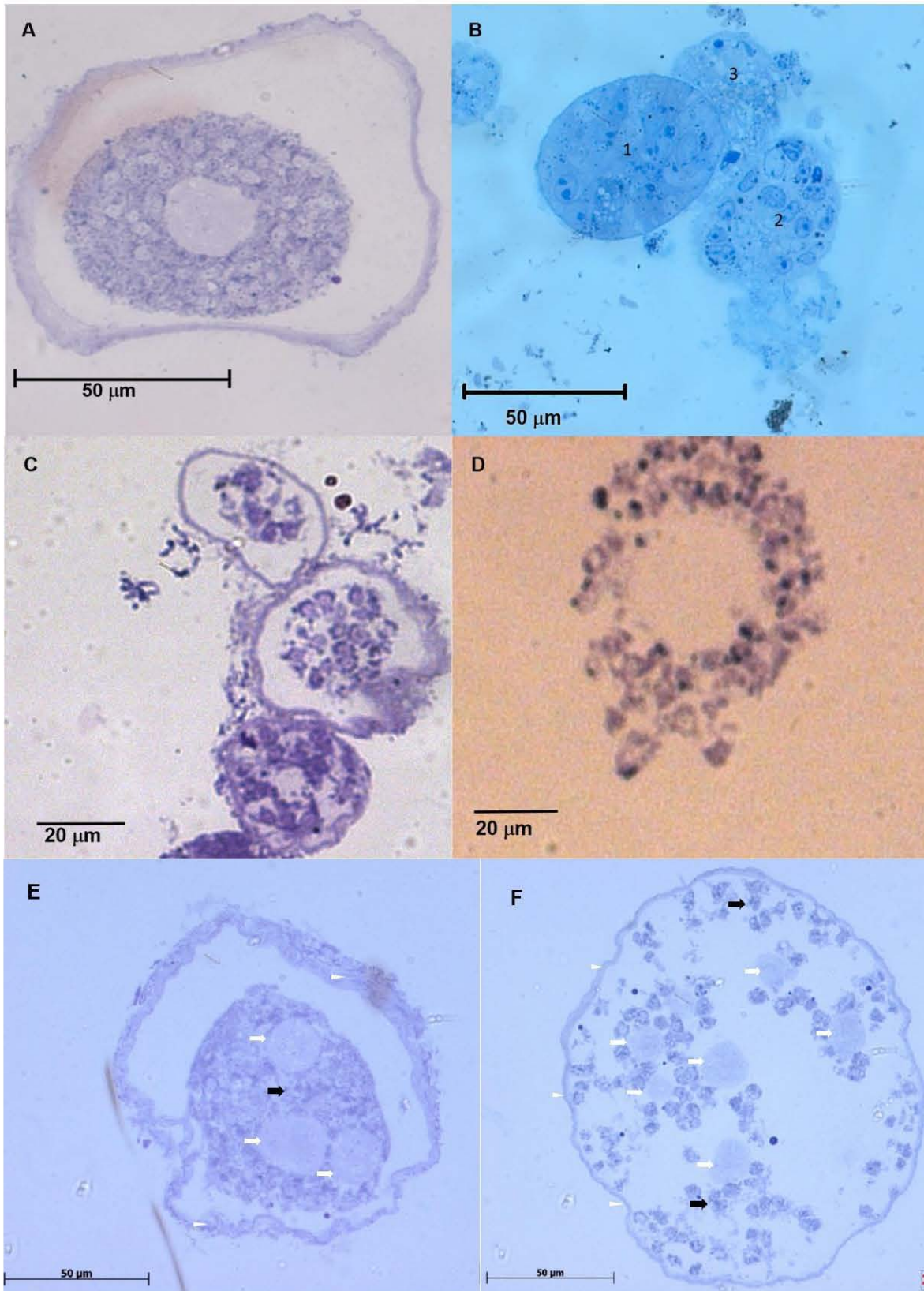


Figura 18. Folículos preantrales aislados y cultivados *in vitro* durante 8 y 16 días. La imagen A y B1 corresponden a los dos folículos Control al día 8 de cultivo que mejor preservaron su estructura al momento

de su evaluación bajo el microscopio de luz. Al mismo tiempo, en la imagen B se aprecia el grado de degeneración intermedio (B2) y avanzado (B3) de dos folículos adyacentes al B1. Con respecto a las imágenes C, D, E y F, representan en su totalidad a las características observadas en el resto de los folículos cultivados por 8 y 16 días. De manera puntual se aprecian residuos de células de la granulosa (Flechas oscuras) y una marcada presencia de la membrana basal (Puntas de flecha) que en lo particular es la principal característica que define a estas imágenes, también es posible apreciar fragmentos citoplásmicos del ovocito (Flechas claras).

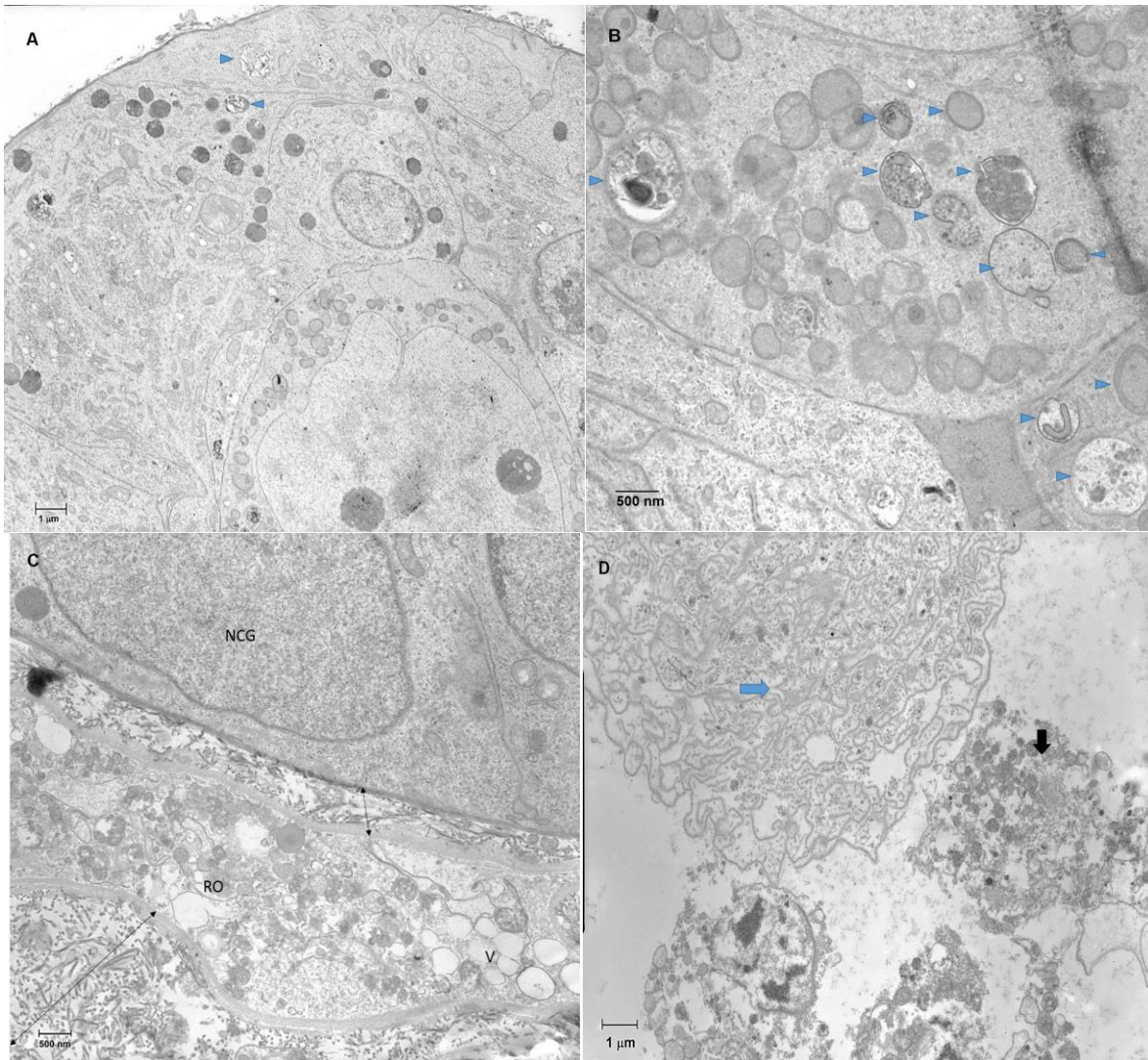


Figura 19. Ultraestructura de folículos Control y criopreservados cultivados *in vitro*. Las figuras 19A y 19B corresponde a los folículos íntegros observados en el grupo Control y cultivados por 8 días y se puede apreciar la buena conformación del citoplasma y núcleo del ovocito, así como de sus células de la granulosa con sus organelos. La presencia de autofagosomas (AF), muestra la importante actividad autofágica que se lleva a cabo en los ovocitos (puntas de flecha), antes (figura 10) y después del cultivo. La figura 19C ilustra el engrosamiento y la posible fusión de membranas basales (flechas con doble cabeza) de folículos que se aglutinaron durante el periodo de cultivo. RO: residuos de organelos; NCG: núcleo de la célula de la granulosa; V: vesículas. En la figura 19D se indican con la flecha oscura los residuos de las células de la granulosa y la flecha azul indica los detritus de lo que fue un ovocito, ambos residuos fueron semejantes en todas las evaluaciones de folículos criopreservados.

4.5 DISCUSIÓN

La criopreservación del tejido ovárico cortical (TOC) es una opción muy prometedora capaz de contener y resguardar la actividad de foliculogénesis y esteroidogénesis de la hembra (Song *et al.*, 2010). La evaluación de pequeños bloques de corteza potencialmente ideales para usarse como injertos (Isachenko *et al.*, 2013) o la disgregación mecánica y/o enzimática del tejido ovárico para el aislamiento de los folículos preantrales destinados a cultivo (Araújo *et al.*, 2015), son alternativas de valoración de la eficiencia o de los efectos nocivos causados posterior a la descongelación que pueden comprometer la viabilidad e integridad durante los procesos de maduración *in vivo* o *in vitro*, respectivamente. El objetivo de la presente investigación fue evaluar únicamente el efecto del cultivo en la sobrevivencia e integridad de folículos aislados de tejido ovárico cortical bovino previamente criopreservado bajo los tratamientos EG, DMSO, GLI, VC, VDF y no criopreservado (Control). Bajo ninguna circunstancia se pretendió inducir crecimiento o diferenciación folicular.

Los resultados en ésta investigación únicamente nos mostraron la presencia de 2 folículos preantrales bovinos con buena morfología pertenecientes al grupo control no criopreservado al día 8 de cultivo. Ante tal evidencia, la determinación de la posible causa que nos condujo a estos resultados fue inminente. En primer lugar, es posible descartar que todos los folículos aislados (mecánica y enzimáticamente) y provenientes de tejido previamente criopreservado o no, estuviesen bajo un proceso que comprometiera su integridad y su posible competencia de desarrollo previo al cultivo, ya que los resultados del experimento 2 de ésta investigación, fueron contundentes con respecto a la morfología, viabilidad y ultraestructura.

En segundo lugar, todos los procesos metodológicos fueron realizados por el mismo operario para evitar sesgo en los tiempos de trabajo establecidos para esta investigación. En tercer lugar, todos los procesos de cultivo se llevaron dentro de la misma incubadora, bajo las mismas condiciones de cultivo y no se identificaron variaciones durante el proceso.

En cuarto lugar, respecto al medio de cultivo, bajo el cual se mantuvieron en incubación los folículos de cada tratamiento, existe la posibilidad que en el intento por imitar el ambiente *in vivo* de los folículos preantrales, de proveer con nutrientes y condiciones óptimas que permitieran la sobrevivencia, no haya sido el adecuado. Tomando en cuenta que los medios de cultivo base que se encuentran en el mercado son diseñados para células diploides, ovocitos o embriones, químicamente definidos y pueden diferir en sus concentraciones de sales orgánicas aminoácidos, vitaminas y azúcares necesarias para estadios tempranos (Haag *et al.*, 2013).

Por lo tanto, es necesaria la suplementación o enriquecimiento con antibióticos, agentes reductores, suero, hormonas o factores de crecimiento (O'Brien *et al.*, 2003), según el objetivo en el cultivo. Uno de estos medios es el Waymouth MB752, utilizado en éste experimento y previamente usado por otros investigadores de forma exitosa en el cultivo de TOC de bovinos (Gigli *et al.*, 2006) y en folículos preantrales aislados en ovinos (Muruvi *et al.*, 2009), con satisfactorios resultados observados en la sobrevivencia y diferenciación de folículos primarios a secundarios. Sin embargo, en un estudio previo realizado por O'Brien

et al. (2003), luego de evaluar el efecto de los medios Waymouth y MEM α en dos protocolos de cultivo, determinaron para el medio Waymouth un mejor crecimiento y desarrollo únicamente de folículos preantrales primordiales. Curiosamente el medio MEM α fue más benéfico para el desarrollo de folículos primarios y secundarios y no así para primordiales. Estas variaciones fueron atribuidas a las diferentes concentraciones de glucosa en Waymouth (27.8mM) y MEM α (5.5mM), y a causa de esto fue posible concluir que una elevada concentración molar de glucosa en el medio de cultivo *in vitro* afecta la sobrevivencia y reanudación meiótica de los folículos primarios y secundarios en ratones debido a su escasa capacidad enzimática que les permite metabolizar ciertos azúcares (Morohaku *et al.*, 2016). Con base a estos resultados previos, es posible que el elevado nivel de glucosa en nuestro medio de cultivo haya intervenido en la degeneración de los folículos previamente criopreservados y control. No obstante, más estudios son requeridos para el establecimiento y evaluación de un sistema *in vitro* que se acerque a las condiciones fisiológicas *in vivo* necesarias para valorar el mantenimiento, crecimiento y diferenciación de folículos preantrales bovinos.

5.0 REFERENCIAS

1. Aerts JMJ, De Clercq JBP, Andries S, Leroy JLMR, Van Aelst S, Bols PEJ. Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. *Cryobiology*. 2008; 57: 163-169. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.07.011
2. Aerts JMJ, Bols PEJ. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and preantral follicle development. *Reprod Dom Anim*. 2010; 45: 171-179. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x
3. Alabedalkarim NM, Bozhoka GA, Legach EI, Ustichenko VD, Zubov PM, Bilyavskaya SB, Dudetskaya GV, Bondarenko TP, Hoffmann MW. Outcome of adrenal tissue fragments allotransplantation: The impact of cryopreservation. *Cryobiology*. 2012; 65: 188-195. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.05.013
4. Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Meister H, Ferreira JO, Franco RL, Cavaltante AA, Radaelli MR, Bahls AS, Moron AF, Murta CG. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum Reprod*. 2004; 19(6): 1287-1293. Doi: 10.1093/humrep/deh246
5. American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2006; 86(4): S142-147. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.08.083
6. Andrade ER, Seneda MM, Alfieri AA, De Oliveira JA, Rodrigues APF, Bracarense L, Figueiredo JR, Tonioli R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*. 2005; 64: 1104-1113. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.03.001
7. Araújo VR, Almeida AP, Magalhães DM, Matos MHT, Tavares LMT, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Papel das Proteínas Morfogenéticas Ósseas -6 e -7 (BMP-6 e -7) na regulação da foliculogênese inicial em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2010; 34: 69-78.
8. Araújo VR, Gastal MO, Wischral A, Figueiredo JR, Gastal EL. Long-term in vitro culture of bovine preantral follicles: Effect of base medium and medium replacement methods. *Anim Reprod Sci*. 2015; 161: 23-31. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.07.006
9. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*. 2014; 81: 96-102. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.011
10. Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology* 2010; 74: 884-94. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.04.013
11. Barnett KR, Schilling CCR, Greenfield CR, Tomic D, Flaws JA. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update*. 2006. 12(5): 537-555. Doi: 10.1093/humupd/dml022

12. Baudot A, Courbiere B, Odagescu V, Salle B, Mazoyer C, Massardier J, Lornage J. Towards whole sheep ovary cryopreservation. *Cryobiology*. 2007; 55: 236-248. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.08.004
13. Bordes A, Lornage J, Demirci B, Franck M, Courbiere B, Guerin JF, Salle B. Normal gestations and live births after orthotopic auto-graft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Hum Reprod*. 2005; 20(10): 2745-2748. Doi: 10.1093/humrep/dei155
14. Borges EN, Silva RC, Futino DO, Rocha-Junior CMC, Amorim CA, Bão SN, Lucci CM. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*. 2009; 59: 195-200. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.07.003
15. Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C, Cotichio G. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Hum Reprod*. 2006; 21(2): 512-517. Doi: 10.1093/humrep/dei346
16. Braslavsky R, Drori Y, Celik MB, Dolev PL, Davies. Ice binding proteins and their dynamic interaction with ice. *Cryobiology*. 2012; 65: 348-349. Abstracts. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.07.032
17. Buratini Jr J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2007; 31: 190-196.
18. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod*. 2000; 15(6): 1300-1304. Doi: 10.1093/humrep/15.6.1300
19. Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro SV, Luz HKM, Rossetto R, Lopes CAP, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology*. 2011; 76(5): 933-941. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.04.024
20. Celestino JJ, Dos Santos RR, Lopes CA, Martins FS, Matos MH, Melo MA, Bao SN, Rodrigues AP, Silva JR, De Figueiredo JR. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*. 2008; 108(3-4): 309-318. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.08.016
21. Celestino JJH, Silva CMG, Castro SV, Figueiredo JR. Fator de crescimento epidermal como mediador de sobrevivência e desenvolvimento folicular. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2012; 36: 148-157.
22. Cisneros PJJ, Montiel PF, Canseco SR, Merchant LH. Ultrastructure of bovine preantral follicles: effect of the slaughterhouse aseptic process on follicular integrity. *Vet Mex OA*. 2017; 4(2): 1-13. Doi: 10.21753/vmoa.4.2.424.
23. Celestino JJH, Santos RR, Matos MHT, Costa SHF, Silva JRV, Martins FS, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Preservation of bovine preantral follicles in 0.9% saline solution or TCM 199. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2007; 59: 591-599.

24. Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yang YS. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod.* 2006; 21 (11): 2794-2800. Doi: 10.1093/humrep/del210
25. Choi JY, Lee J, Lee EY, Yoon BK, Bae DS, Choi DS. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. *Cryobiology.* 2007; 54: 55-62. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.11.003
26. Courbiere B, Massardier J, Salle B, Mazoyer C, Guerin JF, Lornage J. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertil Steril.* 2005; 84(2): 1065-1071. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.03.079
27. Courbiere B, Odagescu V, Baudot A, Massardier J, Mazoyer C, Salle B, Lornage J. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertil Steril.* 2006; 86(4):1243-1251. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.05.019
28. Cui X, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Rinker B. Cryopreservation of composite tissues and transplantation: Preliminary studies. *Cryobiology.* 2007; 55: 295-304. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.08.013
29. Dalcin L, Lucci CM. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2010; 34(3): 149-159.
30. De los Reyes M, Stuard JA, Barros C. Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario bovino in vitro. *Vet Méx.* 2003; 34(4): 389-395.
31. Demirci B, Lornage J, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil Steril.* 2001; 75(4): 754-762. Doi: 10.1016/S0015-0282(00)01787-8
32. Díez C, Muñoz M, Caamaño JN, Gómez E. Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. *Reprod Dom Anim.* 2012; 47(3): 76-83. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02029.x
33. Diniz EG, Esper CR, Jacomini JO, Vieira RC. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2005; 57: 70-76.
34. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Picard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A. (a). Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: Case report. *Hum Reprod.* 2006; 21: 183-188. Doi: 10.1093/humrep/dei268
35. Donnez, J. Martinez-Madrid, B. Jadoul, P. Van Langendonck, A. Demylle, D. Dolmans, M-M (b). 2006. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update.* 12(5):519-535. Doi: 10.1093/humupd/dml032

36. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017; 76: 74-91. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004
37. Elmoazzen HY, Elliont JAW, McGann LE. 2005. Cryoprotectant equilibration in tissues. *Cryobiology*. 51: 85-91. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2005.05.003
38. Fadda S, y Cincotti A. Modelling the cryopreservation process: The effect of the cell size distribution. *Cryobiology*. 2012; 65(3): 354. Abstracts (354). Doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.07.047
39. Faheem MS, Carvalhais I, Chaveiro A, Moreira da Silva F. In vitro oocyte fertilization and subsequent embryonic development after cryopreservation of bovine ovarian tissue, using an effective approach for oocyte collection. *Anim Reprod Sci*. 2011; 125(1-4): 49-55. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.02.011
40. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*. 2003; 78: 203-216. Doi: 10.1016/S0378-4320(03)00091-5
41. Fatehi R, Ebrahimi B, Shahhosseini M, Farrokhi A, Fathi R. Effect of ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression. *Theriogenology*. 2014; 81(2): 302-308. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.029
42. Fauque P, Amor AB, Joanne C, Agnani G, Bresson JL, Roux C. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. *Fertil Steril*. 2007; 87(5): 1200-1207. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.08.115
43. Faustino LR, Santos RR, Silva CMG, Pinto LC, Celestino JJH, Campello CC, Figueredo JR, Rodrigues APR. Goat and shepovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. *Anim Reprod Sci*. 2010; 122(1-2): 90-97. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.001
44. Filipiak Y, Larocca C. Utilización del azul tripan para diferenciar ovocitos bovinos vivos y muertos en fertilización in vitro. *Archivos de Zootecnia*. 2012; 61 (234): 309-312.
45. Furuki T. Effect of stereochemistry on the anti-freeze characteristics of carbohydrates. A thermal study of aqueous monosaccharides at subzero temperatures. *Carbohydrates Research*. 2000; 323: 185-191.
46. Gandolfi F, Paffoni A, Brambilla EP, Bonetti S, Brevini TAL, Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and rapid freezing procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril*. 2006; 85: 1150-1156. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.08.062
47. Gao D, Critser J. Cryobiology of embryos, germ cells, and ovaries. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*. 2000; 41(4):1-31
48. Gigli I, Byrd DD, Fortune JE. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles in vitro. *Theriogenology*. 2006; 66 (2): 344-353. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.11.021

49. Gilchrist RB. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Develop.* 2011; 23: 23-31.
50. Godley BF, Shamsi FA, Liang F-Q, Jarrett SG, Davies S, Boulton M. Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005; 280: 21061-21066.
51. Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update.* 2007; 13(6): 591-605. Doi: 10.1093/humupd/dmm028
52. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum Reprod.* 1994; 9: 597-603. Doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138556
53. Haag KT, Magalhães-Padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, Jones KL, Figueiredo JR, Gastal EL. In vitro culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology.* 2013; 79: 911-917. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.01.001
54. Han B, Bischof JC. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology.* 2004; 48: 8-21. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2003.11.002
55. Hasegawa A, Hamada Y, Mehandjiev T, Koyama K. In vitro growth and maturation as well as fertilization of mouse preantral oocytes from vitrified ovaries. *Fertil Steril.* 2004; 81 (1): 824-830. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.08.028
56. Hayashi M, Hariya M, Kayano M, Suzuki H. Distribution of follicles in canine ovary: A simple and rapid method for counting follicles. *Cryobiology.* 2015; 71: 514-517. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.08.014
57. Hopkins JB, Badeau R, Warkentin M, Thorne RE. Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions. *Cryobiology.* 2012; 65(3): 169-178. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.05.010
58. Hosoe M, Shioya Y. Distribution of cortical granules in classified bovine oocyte. *Theriogenology.* 1996; 45(1): 274. Abstract. Doi: 10.1016/0093-691X(96)84747-9
59. Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reproductive Biomedicine Online.* 2005; 10: 729-734.
60. Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 2005; 63: 1717-1751. Doi:10.1016/j.theriogenology.2004.08.005
61. Huang L, Mo Y, Wang W, Li Y, Zhang Q, Yang D. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* 2008; 139: 193-198.
62. Hyttel, P. Sinowatz, F. Vejlsted, M. 2010. Gametogenesis. pp.: 32-55. En: *Essentials of domestic animal embryology*, First edition. SAUNDERS, ELSEVIER. Printed in China. ISBN 978-0-7020-2899-1.
63. Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G, Huber J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in

- pregnancy and live birth. *Fertil Steril.* 2006; 85: 1208-1215. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.11.030
64. Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* 2003; 108: 186-193.
 65. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J, Montag M, Van Der Ven K, Dorn C, Roesing B, Van Der Ven H. Cryopreservation of human ovarian tissue : Comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology.* 2007; 55: 261-268. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.08.008
 66. Isachenko V, Orth I, Isachenko E, Mallmann P, Peters D, Schmidt T, Morgenstern B, Foth D, Hanstein B, Rahimi G. Viability of human ovarian tissue confirmed 5 years after freezing with spontaneous ice-formation by autografting and chorio-allantoic membrane culture. *Cryobiology.* 2013; 66(3): 233-238. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2013.02.003
 67. Jewgenow K, Göritz F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. *Anim Reprod Sci.* 1995; 39:285-297. Doi: 10.1016/0378-4320(95)01397-I
 68. Kagawa N, Kuwayama M, Nakata K, Vajta G, Silber S, Manabe N, Kato O. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved preantral follicles of adult mice. *Reproductive Biomedicine Online.* 2007; 14: 693-699.
 69. Katska L, Rynska B. The isolation and in vitro culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology.* 1998; 50: 213-222. Doi: 10.1016/S0093-691X(98)00128-9
 70. Keros V, Xella S, Hultenby K, Petterson K, Sheikhi M, Volpe A, Hreinsson J, Hovatta O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod.* 2009; 24(7): DOI: 1670-1683. 10.1093/humrep/dep079
 71. Kim SS, Battaglia DE, Soules MR. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertil Steril.* 2001; 75(6): 1049-1056. Doi: 10.1016/S0015-0282(01)01790-3
 72. Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Gosden RG. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril.* 2004; 82: 679-685. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.05.022
 73. Klionsky DJ, Baehrecke EH, Brumell JH, Chu CT, Codogno P, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Elazar Z, Eskelinen EL, Finkbeiner S, Fueyo-Margareto J, Gewirtz DA, Jäättelä M, Kroemer G, Levine B, Melia TJ, Mizushima N, Rubinsztein DC, Simonsen A, Thorburn A, Thumm M, Tooze SA. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy.* 2011; 7(11): 1273-1294. DOI: 10.4161/auto.7.11.17661
 74. Korhonen K, Julkunen H, Kananen K, Bredbacka P, Tiirikka T, Rätty M. The effect of ascorbic acid during biopsy and cryopreservation on viability of bovine embryos

- produced in vivo. *Theriogenology*. 2012; 77: 201-205. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.07.034
75. Kuma A, Mizushima N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: With an emphasis on nutrient metabolism. *Seminars Cell Dev Biol*. 2010; 21:683-690. DOI: 10.1016/j.semcd.2010.03.002
 76. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The CrioTop method. *Theriogenology*. 2007; 67: 73-80. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.014
 77. Lawson A, Ahmad H, Sambanis A. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions. *Cryobiology*. 2011; 62: 115-122. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.01.012
 78. Leitão CCF, Brito IV, Frota IMA, Silva JRV. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2009; 37: 215-224.
 79. Li YB, Zhou CG, Yang GF, Wang O, Dong Y. Modified rapid freezing method for cryopreservation of human ovarian tissue. *Chinese Medical Journal*. 2007; 120: 110-114.
 80. Lima, I.M. Celestino, J.J. Faustino, L.R. Magalhães-Padilha, D.M. Rossetto, R. Brito, I.R. Donato, M.A. Lopes, C.A. Campello, C.C. Peixoto, C.A. Figueiredo, J.R. Rodrigues A.P. Dynamic medium containing kit ligand and follicle-stimulating hormone promotes follicular survival, activation, and growth during long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs*. 2012; 195(3): 260-271.
 81. Lima-Verde IB, Rossetto R, Figueiredo JR. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2011; 35: 472-482.
 82. Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol Reprod*. 2001; 64: 171-178.
 83. Liu LJ, Xie XY, Zhang RZ, Xu P, Bujard H, Jun M. Reproduction and fertility in wild-type and transgenic mice after orthotopic transplantation of cryopreserved ovaries from 10-d-old mice. *Lab Animal (NY)*. 2008; 37: 353-357.
 84. Lopes CAP, Dos Santos RR, Celestino JJDH, Melo MAP, Chaves RN, Campello CC, Silva JRV, Bão SN, Jewgenow K, De Figueiredo JR. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Anim Reprod Sci*. 2009; 115:(1-4): 201-214. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.12.016
 85. Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LHR, Rumpf R, Bão SN. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*. 2004; 61: 1101-1114. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.06.004
 86. Lundy T, Smith P, O'Connell A, Hudson NL, McNatty KP. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J Reprod Fertil*. 1999; 115: 251-262.

87. Luz VB, Santos RR, Pinto LC, Soares AAX, Celestino JJH, Mafezoli J, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Dimethyl sulfoxide perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after cryopreservation. *Fertil Steril.* 2009; 91(4): 1513-1515. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1778
88. Magalhães DM (a), Sales ET, Padilha RT, Silva TFP, Tonioli, Figueiredo RJR. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2012; 36: 32-38.
89. Magalhães DM, Duarte ABG, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IMT, Lopes CAP, Campello CC, Rodrigues APR, Figueiredo JR. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, 2011; 75: 182-188. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.08.004
90. Magalhães-Padilha DM, Andrade PM, Sales ET, Araujo VR, Lima IMT, Castro SV, Faustino LR, Lopes CAP, Campello CC, Bão SN, Gastal MO, Gastal EL, Figueiredo JR. Effect of sequential medium on in vitro culture of goat ovarian cortical tissue. *Anim Reprod Sci.* 2012;132(3-4): 159-168. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.017
91. Mandelbaum J, Anastasiou O, Lévy R, Guérin JF, De Larouzière V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* 2004; 113: 17-23.
92. Martins FS, Silva JRV, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2008; 32: 36-49.
93. Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol.* 1993; 37:407-15.
94. Morohaku K, Hirao Y, Obata Y. Developmental competence of oocytes grown in vitro: Has it peaked already? *J Reprod Dev.* 2016; 62: 1-5. DOI: 10.1262/jrd.2015-148
95. Motyl T, Gajewska M, Zarzynska J, Sobolewska A, Gajkowska B. Regulation of autophagy in bovine mammary epithelial cells. *Autophagy.* 2007; 3(5): 484-486. DOI: 10.4161/auto.4491
96. Muruvi W, Picton HM, Rodway RG, Joyce IM. In vitro growth and differentiation of primary follicles isolated from cryopreservation sheep ovarian tissue. *Anim Reprod Sci.* 2009; 112:35-50. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.001
97. Neto V, Buff S, Lornage J, Bottollier B, Guérin P, Joly T. Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue. *Fertil Steril.* 2008; 89(5): 1348-1356. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.046
98. Nottola SA, Camboni A, Van Langendonck A, Demylle D, Macchiarelli G, Dolmans M-M, Martínez-Madrid B, Correr S, Donnez J. Cryopreservation and

- xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertil Steril*. 2008; 90(1):23-32. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.05.069
99. O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod*. 2003; 68: 1682-1686. Doi: 10.1095/biolreprod.102.013029
 100. Oliveira MEF, Ferreira RM, Mingoti GZ. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2011; 35: 418-432.
 101. Ortiz R, Echevarría OM, Salgado R, Escobar ML, Vazquez-Nin GH. Fine structural and cytochemical analysis of the processes of cell death of oocytes in atretic follicles in new born and prepubertal rats. *Apoptosis*. 2006; 11: 25-37. Doi: 10.1007/s10495-005-3347-0
 102. Otsuka F, and Shimasaki SA. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein-15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 89: 8060-8065.
 103. Palasz AT, Thundathil J, Verall RE, Mapletoft RJ. The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. *Anim Reprod Sci*. 2000; 58(3-4):229-240. Doi: 10.1016/S0378-4320(99)00090-1
 104. París MCJ, Andersen CY, Shaw JM. Ovarian cryopreservation and grafting: Its potential for human reproductive biology and animal conservation. *Anim Reprod*. 2009; 6(1): 96-113.
 105. Passos MJ, Vasconcelos GL, Silva AWB, Brito IR, Saraiva MVA, Magalhães DM, Costa JJN, Donato MAM, Ribeiro RP, Cunha EV, Peixoto CA, Campello CC, Figueiredo JR, Van den Hurk R, Silva JRV. Accelerated growth of bovine preantral follicles in vitro after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. *Theriogenology*. 2013; 79: 1269-1277. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.023
 106. Paulini F, Silva RC, Rôlo JL, Lucci CM. Ultrastructural changes in oocyte during folliculogenesis in domestic mammals. *J Ovarian Research*. 2014; 7(1): 102-114. Doi: 10.1186/s13048-014-0102-6
 107. Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JÁ, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*. 2009; 71: 690-697. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.031
 108. Rahimi G, Isachenko V, Todorov P, Tawadros S, Mallmann P, Nawaroth F, Isachenko E. Apoptosis in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *Cryo Letters*. 2009; 4: 300-309.
 109. Raines CR, Dikeman ME, Unruh JA, Hunt MC, Knock RC. Predicting cattle age from eye lens weight and nitrogen content, dentition, and United States Department of Agriculture maturity score. *J Anim Sci*. 2008; 86: 3557-3567.

110. Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci.* 2004; 84(1-2): 211-227. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2003.12.003
111. Roy SK, and Greenwald GS. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. *Biol Reprod.* 1985; 32: 203-215.
112. Ruiz J, Correa JE, Martínez M. Vitricación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogénico de embriones. *Archivos de Medicina Veterinaria.* 2010; 42: 79-83.
113. Sadeu JC, Cortvrindt R, Ron-El R, Kasterstein E, Smitz J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril.* 2006; 85(1):1130-1141. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.09.038
114. Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2000; 63 (1-2): 27-39. Doi: 10.1016/S0378-4320(00)00162-7
115. Santos RR, Rodrigues APR, Costa SHF, Silva JRV, Matos MHT, Lucci CM, Bão SN, Van den Hurk R, Figueiredo JR. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2006; 91 (3-4): 249-263. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.04.013
116. Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo JR, Silva JR, Van den Hurk R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell and Tissue Research.* 2007; 327: 167-176. **(a)**
117. Santos RR, Van den Hurk R, Rodrigues APR, Costa SHF, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Anim Reprod Sci.* 2007; 99 (1-2): 53-64. **(b)** Doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.05.013
118. Saraiva MVA, Matos MHT, Faustino LR, Celestino JJH, Silva JRV, Figueiredo JR. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2010; 34: 206-221.
119. Schmidt KLT, Ernst E, Byskov AG, Andersen AV, Andersen CY. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum Reprod.* 2003; 18: 2654-2659.
120. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology.* 2000; 53: 59-72. Doi: 10.1016/S0093-691X(99)00240-X
121. Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril.* 2010; 94(6): 2191-2196. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.073

122. Silva JRV, Ferreira MAL, Costa SHF, Figueiredo JR. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. *Ciência Animal Brasileira*. 2002; 12: 105-117.
123. Silva JRV, Hurk RVD, De Matos MHT, Dos Santos RR, Pessoa C, De Moraes MO, De Figueiredo JR. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*. 2004; 61: 1691-1704. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.09.014
124. Song Y, Sharp R, Lu F, Hassan M. The future potential of cryopreservation for assisted reproduction. *Cryobiology*. 2010; 60: 60-65. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.09.009
125. Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano PJJ, Wiemer KE, Cohen J. A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reproductive Biomedical Online*. 2008; 17(3): 360-367.
126. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB. Synthetic polymers improve vitrification outcomes of macaque ovarian tissue as assessed by histological integrity and the in vitro development of secondary follicles. *Cryobiology*. 2012; 65: 1-11. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.04.005
127. Tsuribe PM, Gobbo CAM, Landim-Alvarenga F. Viability of primordial follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue. *Fertil Steril*. 2009; 91(5): 1976-1983. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.03.031
128. Vajta G, and Nagy Z. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive Biomedical online*. 2006; 12: 779-796.
129. Von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, Keros V, Maltaris T, Montag M, Salle B, Sonmezer M, Andersen CY. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy: A technique in its infancy but already successful in fertility preservation. *European Journal of Cancer*. 2009; 45: 1547-1553.
130. Wang X, Cheng H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, Gosden RG. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature*. 2002; 24: 385.
131. Wang X, Cui XD, Gao DY, Pu L, Yu JP, Han X. Preliminary success of testis cryopreservation and transplantation in the rat. Abstracts of annual meeting of the society for cryobiology 2004. *Cryobiology*. 2004; 49: 296-297. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.10.001
132. Wang Y, Xiao Z, Li L, Fan W, Li SW. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod*. 2008; 23: 2256-2265.
133. Wildt DE. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*. 2000; 41: 228-234.
134. Woods, E.J. Benson, J.D. Agca, Y. Critser, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 48(2): 146-156. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.03.002

135. Woods EJ, Wells HB. Cryobiology in the future. *Cryobiology*. 2013; 67(3): 398. Abstracts. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.09.008
136. Wu J, Emery BR, Carrell DT. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*. 2001. 64:375-81.
137. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*. 2007. 67: 81-89. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.029
138. Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertil Steril*. 2005; 83(4): 1248-1254. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.036
139. Zhou XH, Wu YJ, Shi J, Xia Y, Zheng SS. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology*. 2010; 60: 101-105. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.02.006