

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE
CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO EN PERRAS**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

NOÉ EDUARDO GÓMEZ NEPOMUCENO

TUTOR:

DRA. ROSA MARÍA PÁRAMO RAMÍREZ

COMITÉ TUTORAL:

DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR

DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA

MÉXICO D.F.

2005

m343297



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.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi cariño:

A mi hija Regina.

A Lourdes Contreras, por estar a mi lado y por traer a Regina.

A mi papá Noé Gómez y a mi mamá María de la Luz Nepomuceno por todo lo que me han dado.

A mis hermanos Fabián y Noemí que siempre están conmigo.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Noé Eduardo Gómez
Nepomuceno

FECHA: 20/04/2005

FIRMA: Noé Gómez

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Páramo por aceptarme como su alumno de posgrado, y a los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Susana Mendosa y el Dr. Carlos Gutiérrez, por su apoyo en la realización de esta tesis.

A las Doctoras Arantza Lassala y Lucía Rangel, por su valiosa ayuda en el laboratorio.

A los Doctores Yolanda Gutiérrez, Ernesto Hernández y Filiberto Fernández, por su amistad y apoyo.

Al MVZ Leobardo Palomino, por su asistencia en cirugía.

A los señores Roberto Contreras y Lourdes Arreola por apoyarme en todo momento.

A mis amigos y compañeros de posgrado: Ana, Esperanza, Gabriela, Cipatti, Brenda, Nicolás, Víctor, Cesar, Toño, Agustín y a todos los que en este momento se me olvidan.

A todas las personas que me ayudaron a obtener el material biológico para terminar esta tesis.

RESUMEN

La criopreservación de tejido ovárico y su autotransplante pueden ser utilizadas como herramientas importantes para el rescate de gametos de caninos domésticos o silvestres con alto valor genético, por lo que la perra doméstica se utilizó como modelo experimental para la implementación de esta técnica. Se obtuvieron un total de 35 muestras de corteza ovárica (5x5x2 mm) las cuales se introdujeron en medio TCM-199 con 10% de SFB mas 1.5 M de DMSO y fueron almacenados en viales para su congelación en nitrógeno líquido. La disección de los folículos se realizó de forma mecánica, tanto en tejido fresco como en tejido postdescongelado. La sobrevivencia folicular fue evaluada realizando una tinción con una solución de azul tripán al 0.4 % y observándolos a 400x con un microscopio invertido contando los folículos teñidos (muertos) y no teñidos (vivos). Además se utilizaron 5 perras adultas para evaluar el autotransplante de tejido ovárico congelado y descongelado. Los resultados del porcentaje de folículos vivos antes y después de congelar fueron $92.79 \pm 6.63\%$ y $50.49 \pm 9.03\%$ respectivamente, la edad no tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de folículos vivos postdescongelado ni antes de congelar. La probabilidad de sobrevivencia calculada por regresión logística fue de alrededor de 50%. Se pudo recupera tejido ovárico 3 meses después, de 4 de las 5 perras utilizadas para al autotransplante y se encontraron folículos primordiales, primarios y secundarios en tres de las 5 perras. Estos resultados indican que es posible que algunos folículos sobrevivan a los procesos de obtención, criopreservación y autotransplante de tejido ovárico y que es posible utilizar un protocolo de congelación desarrollado en otras especies.

Palabras clave: Criopreservación, Tejido ovárico, Folículo, Perra, Autotransplante.

ABSTRACT

The ovarian tissue cryopreservation and autotransplantation can be used as an important tool for the rescue of gametes in canine domestic or wild with high genetic value, for this reason the domestic dog was used like experimental model for the implementation of this technique. A total of 35 samples of ovarian cortex were obtained (5x5x2 mm pieces) which were introduced in medium TCM-199 with 10% of SFB and 1.5 M of DMSO and they were stored in vials for their freezing in liquid nitrogen. Follicles were mechanically dissected, in both thawed and fresh tissue, follicular survival, was evaluated after staining them with 0.4% trypan blue solution and observed at 400x in an inverted microscope. Dead follicles will uptake the dye whilst those alive will not. In addition, 5 adult bitches were autotransplanted with frozen-thawed ovarian cortex. The results of the percentage of alive follicles before and after freezing they were $92.79\pm 6.63\%$ and $50.49\pm 9.03\%$ respectively, the age had no effect on the percentage of follicles alive before and after freezing-thawed, Survival probability calculated by logistic regression were around 50%. Ovarian tissue was recovers 3 months later in 4 of the 5 bitches used in autotransplantation and found primordial, primary and secondary follicles in three of the 5 bitches, These results indicate that it's possible that some follicles survive the processes of obtaining, cryopreservation and autotransplantation of ovarian tissue and it's possible to use a freezing protocol developed in other species.

Key words: Cryopreservation, Ovarian tissue, Follicle, Bitch, Autotransplantation

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Criopreservación.	3
2.2 Tamaño de tejido a congelar.	6
2.3 Crioprotectores.	7
2.4 Protocolos de congelación y descongelación.	8
2.5 Evaluación del tejido postdescongelado.	11
2.6 Transplante de tejido.	11
2.7 Cultivo <i>in vitro</i> de tejido y folículos.	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVO GENERAL	15
4.1. Objetivos específicos.	15
5. HIPÓTESIS	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS	16
6.1 Efecto de la congelación de corteza en la supervivencia de folículos ováricos.	16
6.1.1 Obtención de los ovarios.	16
6.1.2 Obtención de Corteza Ovárica.	16
6.1.3 Congelación.	17
6.1.4 Viabilidad.	18
6.2 Efecto de la congelación y autotransplante de corteza ovárica en la	18

sobrevivencia y desarrollo folicular.	
6.2.1 Animales utilizados para reimplantación del tejido ovárico.	18
6.2.2 Procedimiento de reimplantación.	19
6.3 Análisis Estadístico.	20
7. RESULTADOS	21
7.1 Resultados del efecto de la congelación de corteza en la sobrevivencia de folículos ováricos.	21
7.2 Efecto de la congelación y autotransplante de corteza ovárica en la sobrevivencia y desarrollo folicular.	25
8. DISCUSIÓN	28
9. CONCLUSIONES	37
10. LITERATURA CITADA	38
11. ANEXOS	48
11.1 Fotos obtención y evaluación de folículos.	48
11.2 Fotos técnicas de transplante.	51
11.3 Fotos recuperación de tejido ovárico.	54
11.4. Comparación fotográfica de cortes histológicos obtenidos de tejido ovárico en el Wombat (canguro) (Wolvekampa, 2001) y la perra doméstica.	57

1. INTRODUCCIÓN

En los animales en peligro de extinción, la contribución genética individual es extremadamente valiosa para la conservación de una especie, por lo que el rescate y la preservación de los gametos al tiempo de la muerte de un individuo es fundamental para no perder la contribución genética individual en estas especies (Durrant y cols., 1998). Este es el caso del lobo mexicano (*C. lupus baileyi*) perteneciente a la familia de los cánidos.

A pesar de que la primera inseminación artificial exitosa, y la primera descripción real de un ovocito, se realizaron en la especie canina hace cientos de años, 1780 y 1827 respectivamente, la investigación básica y la biotecnología reproductiva en los caninos han quedado rezagadas, comparadas con otras especies (Farstad, 2000a). Por esta razón, es necesario validar nuevas técnicas en reproducción asistida (Farstad, 2000b). Tal es el caso de la criopreservación de tejido ovárico (CTO) (Ledda y cols., 2001), la cual puede ser utilizada como una importante herramienta para el rescate de células germinales de caninos domésticos o silvestres con alto valor genético y que hayan muerto inesperadamente por accidente o enfermedad (Demirci y cols., 2003). Además de que hay una gran demanda para desarrollar nuevas tecnologías para la preservación del germoplasma de las perras domésticas sobresalientes, o de las pocas razas caninas domésticas raras (Durrant y cols., 1998). Por esta razón, los bancos de tejido ovárico pueden ser considerados como una opción para el almacenamiento genómico cuando no existe la posibilidad de congelar gametos o embriones (Shaw y cols., 2000)

La criopreservación de tejido ovárico no es una tecnología nueva, sin embargo es en la década de los 90' s que se retoma su utilización combinándola con otras técnicas como el transplante de tejidos. Esta técnica se ha usado tanto en el ser humano (Aubard y cols., 2001; Gosden, 2000) como en los animales con

el fin de recuperar gametos femeninos por diferentes razones (Kim y cols., 2003; Liu y cols., 2000), como la menopausia prematura en la mujer y la creación de bancos de material genético en los animales amenazados o en peligro de extinción. Además, como la colección de tejido ovárico no depende de la edad o estado reproductivo del individuo, la criopreservación de dicho tejido puede ser un método ideal, para el almacenamiento de un gran número de gametos obtenidos de una sola hembra en un solo paso (Ledda, 2001; Paris y cols., 2004). Por lo anterior, la perra doméstica podría ser utilizada para la implementación de ésta tecnología y utilizada posteriormente en caninos de alto valor genético, económico amenazados o en peligro de extinción.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Aunque la criopreservación de embriones es un procedimiento ampliamente usado desde 1973 en los animales de laboratorio, en la especie bovina y relativamente bien establecido en especies como los ovinos y los caprinos (Massip, 2001), es poco practica cuando se busca recobrar material genético de un animal muerto. Otra opción podría ser la colección de ovocitos de folículos antrales y su criopreservación, sin embargo los ovocitos tienen una estructura subcelular relativamente compleja, en la cual muchos de los componentes son particularmente sensibles a las bajas temperaturas (Yuksel, 2000), por lo que los resultados en la congelación de estos gametos son impredecibles y este método es utilizado raramente con fines comerciales (Shaw y cols., 2000).

La criopreservación de tejido ovárico es un procedimiento con el cual se han tenido resultados satisfactorios, ya que al transplantar el tejido congelado-descongelado, se ha obtenido el desarrollo de folículos antrales, el retorno de la actividad esteroideogénica del tejido e incluso el nacimiento de crías en especies como el ratón, la rata y la borrega (Gunasena y cols., 1997).

el fin de recuperar gametos femeninos por diferentes razones (Kim y cols., 2003; Liu y cols., 2000), como la menopausia prematura en la mujer y la creación de bancos de material genético en los animales amenazados o en peligro de extinción. Además, como la colección de tejido ovárico no depende de la edad o estado reproductivo del individuo, la criopreservación de dicho tejido puede ser un método ideal, para el almacenamiento de un gran número de gametos obtenidos de una sola hembra en un solo paso (Ledda, 2001; Paris y cols., 2004). Por lo anterior, la perra doméstica podría ser utilizada para la implementación de ésta tecnología y utilizada posteriormente en caninos de alto valor genético, económico amenazados o en peligro de extinción.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Aunque la criopreservación de embriones es un procedimiento ampliamente usado desde 1973 en los animales de laboratorio, en la especie bovina y relativamente bien establecido en especies como los ovinos y los caprinos (Massip, 2001), es poco practica cuando se busca recobrar material genético de un animal muerto. Otra opción podría ser la colección de ovocitos de folículos antrales y su criopreservación, sin embargo los ovocitos tienen una estructura subcelular relativamente compleja, en la cual muchos de los componentes son particularmente sensibles a las bajas temperaturas (Yuksel, 2000), por lo que los resultados en la congelación de estos gametos son impredecibles y este método es utilizado raramente con fines comerciales (Shaw y cols., 2000).

La criopreservación de tejido ovárico es un procedimiento con el cual se han tenido resultados satisfactorios, ya que al transplantar el tejido congelado-descongelado, se ha obtenido el desarrollo de folículos antrales, el retorno de la actividad esteroideogénica del tejido e incluso el nacimiento de crías en especies como el ratón, la rata y la borrega (Gunasena y cols., 1997).

2.1 Criopreservación

La criopreservación es un proceso de múltiples pasos que involucran la exposición inicial de las células o tejidos a agentes crioprotectores, el enfriamiento a temperaturas bajo cero, almacenamiento, descongelación y finalmente la dilución y la remoción del agente crioprotector. Durante todo el proceso, la célula o el tejido debe mantener su integridad estructural, por lo que los métodos desarrollados para la criopreservación de tejido ovárico, también deben de proteger su viabilidad estructural y funcional.

Durante el proceso de congelación, pueden ocurrir dos tipos de daño sobre el material biológico, uno es la formación de hielo intracelular, cuando la muestra es enfriada "muy rápidamente", ocasionando que el agua quede atrapada dentro de la célula (Gao and Critser, 2000). El segundo tipo de daño ocurre cuando la célula es enfriada muy lentamente, lo cual causa que sea expuesta a una alta concentración de solutos (Shaw y cols., 2000).

Uno de los factores mas importantes que gobierna el proceso de enfriamiento lento, es la velocidad con la que el crioprotector y el agua pasan a través de la membrana celular, esta velocidad depende de la composición de la membrana; de la variación de la permeabilidad a diferentes temperaturas, característica de la membrana hacia el agua y al crioprotector y de la relación superficie-volumen (Demirci y cols., 2003).

El mayor daño se observa cuando la temperatura se encuentra entre +15° C y -90° C, aunque las temperaturas entre +30° C y los 0° C pueden comprometer la integridad membranal y del citoesqueleto, además del metabolismo celular y la capacidad celular para controlar y reparar el daño. Estudios en células aisladas indican que la formación de hielo intracelular se da a -40° C (Shaw y cols., 2000).

En 1954, (Deanesly, citado por Yuksel 2000) se realizaron los primeros experimentos criopreservando piezas relativamente grandes de tejido (la mitad de un ovario de rata) utilizando un protocolo que consistía en un enfriamiento lento hasta -79°C en presencia de 15% de glicerol. Observándose que la región central no sobrevive tan bien como la región periférica. En el contexto de la preservación de especies, la corteza ovárica es la más importante debido a la presencia de un abundante número de folículos primordiales, los cuales son el objetivo de la criopreservación, además los folículos preantrales representan el 90% de la población folicular en los mamíferos (Silva y cols., 2004).

El ovario se divide en dos grandes regiones, corteza y médula. La capa más externa es la túnica albugínea compuesta de fibras de tejido conectivo y la superficie del ovario está rodeada por una capa de células planas. Mientras que la región de la corteza contiene las unidades funcionales como son los folículos, cuerpos lúteos y tejido intersticial, la médula consiste mayormente de vasos sanguíneos, linfáticos y tejido conectivo (Yuksel, 2000).

Un folículo primordial consiste en una capa simple de células somáticas precursoras del *cumulus* y de las células de la granulosa, y contiene un ovocito extremadamente pequeño y detenido en profase I de la meiosis. El número total de folículos primordiales que contiene un ovario al momento del nacimiento, varía entre especies y es de alrededor de 100,000 folículos por ovario en la perra (Andersen and Simpson 1973), 1500 en el ratón y 1 millón en el caso de la mujer. El diámetro del folículo aumenta, cuando un ovocito entra en proceso de maduración (Shaw y cols., 2000).

El folículo primordial tiene algunas características, que pueden hacerlo menos vulnerable al daño criogénico comparado con un ovocito maduro. Las más importantes de estas características son: a) el pequeño tamaño del ovocito y sus células de soporte (el diámetro total del ovocito esta entre 30 y 60 μm), b) una baja

tasa metabólica, c) el estadio del ciclo celular (detenido en profase de la meiosis I), d) bajo número de células de soporte, e) ausencia de zona pelúcida y f) falta de gránulos corticales periféricos. El pequeño volumen de la célula germinal reduce los problemas asociados con el movimiento del agua y el crioprotector dentro y fuera de la célula durante la congelación, por tener una mejor interacción con los componentes del medio que lo rodea. Algunos estudios han demostrado que incluso variaciones menores en la temperatura ambiental pueden resultar en daño a la proteína tubulina en el huso (los microtúbulos son tubos cilíndricos de 20-25 nm en diámetro y están compuestos de subunidades de la proteína tubulina, los microtúbulos también forman las fibras del huso para separar los cromosomas durante la mitosis), sin embargo algo de ese daño puede ser reversible. Si bien los cromosomas pueden re-ensamblarse y alinearse a lo largo del huso ecuatorial al descongelar la célula, también hay un riesgo de pérdida cromosomal (Oktay y cols., 2000).

Por otra parte, se sabe que otros elementos del citoesqueleto del ovocito en un folículo antral son dañados por el proceso de criopreservación, lo cual puede llevar a cambios significativos en la organización y tráfico de moléculas y organelos. Por otro lado algunos estudios han demostrado que la criopreservación puede resultar en endurecimiento de la zona pelúcida previniendo así la fertilización natural (Oktay y cols., 2000).

Andersen y Simpson (1973) encontraron que la formación de folículos primordiales en la perra Beagle ocurre entre los días 17 y 54 después del nacimiento y que por el día 120 después del nacimiento se desarrollan los primeros folículos primarios grandes con zona pelúcida visible y múltiples capas de células de la granulosa. Además, la formación de folículos antrales pequeños ocurre entre el día 120 y 165 postnacimiento. Estos hallazgos indican que el reclutamiento de los folículos primordiales a folículos antrales tempranos en perras

prepúberes ocurre en un período de 66-148 días postnacimiento (Metcalf y cols., 2001).

2.2 Tamaño del tejido a congelar

Comparado con una célula individual suspendida, la criopreservación de un tejido presenta serios contrastes físicos relacionados con la transferencia de calor y masa. Al ser el ovario una estructura multicelular en la cual se conoce la interacción que existe entre las células que lo conforman, la dinámica de permeabilidad del crioprotector dentro y fuera del tejido debe ser considerada durante la criopreservación (Yuksel, 2000).

Cuando se introduce un tejido en soluciones crioprotectoras hiperosmóticas, el agua puede ser osmóticamente drenada de células individuales y transferida al espacio extracelular y a los vasos sanguíneos existentes. Esta agua es destinada a formar grandes estructuras de hielo, las cuales pueden lesionar al tejido durante el congelamiento y descongelamiento. Tomando esto en cuenta, se puede esperar una mejor sobrevivencia de folículos primordiales debido a su pequeño tamaño y a su falta de fluido folicular (Shaw y cols., 2000), y se sabe además, que los folículos primordiales en un trozo de corte ovárico pueden mantenerse viables a una temperatura de -196°C (Demirci y cols., 2001).

Aunque los ovarios completos de rata y ratón pueden sobrevivir a la congelación por su talla pequeña, los ovarios completos de otras especies de mamíferos domésticos y del ser humano pueden tener dificultades por su gran masa y su limitada transferencia calórica. Una seria limitante para la aplicación de los protocolos de criopreservación ovárica disponibles actualmente, es que no son efectivos para grandes secciones de corteza ovárica. Por lo tanto, la criopreservación de pequeñas piezas de tejido ovárico es más conveniente, porque la relación de intercambio de crioprotector/agua se ve afectada por la cantidad de tejido por el cual debe difundirse el crioprotector (Shaw y cols., 2000).

Jeremias y cols. (2001), trabajando con ovarios de cerda, encontraron que criopreservando piezas con una medida de 5 mm² se podían mantener mejor sus características, comparadas con piezas más pequeñas las cuales están sujetas a un mayor daño mecánico. Sin embargo Gook y cols. (2001) en su estudio utilizaron fragmentos de corteza ovárica de ratón con medidas de 0.5X1X1 mm y Lieberman y cols. (2001) utilizaron piezas de 10X5X1-2 mm obtenidas de ovario de ser humano con buenos resultados.

2.3 Crioprotectores

El interés en la investigación sobre CTO no recibió mucha atención antes de la década de los 90's, en parte por la baja sobrevivencia del tejido post-descongelado y la falta de técnicas reproductivas que acompañaran el aprovechamiento de esta tecnología. En los 90's, otros compuestos como el dimetil sulfoxido (DMSO), el etilén glicol (EG), y el propilén glicol (PG) fueron utilizados por sus propiedades crioprotectoras. Entre éstos, el DMSO es el que más comúnmente se empleó para criopreservar células reproductivas y la mayoría de los estudios realizados en CTO durante esta década, utilizaron 1.5 M de DMSO con un congelamiento lento (0.3-0.5° C por minuto) y sumergiendo en nitrógeno líquido al alcanzar una temperatura de entre -55 y -140° C (Yuksel, 2000).

Muchos crioprotectores pueden ser tóxicos para la célula, esta toxicidad puede deberse a la exposición prolongada a temperaturas sobre los 0° C (Demirci y cols., 2001). Por lo que es deseable alcanzar una rápida permeabilidad de la célula con crioprotectores a bajas temperaturas para minimizar la toxicidad (Kim y cols., 2001).

La experiencia sobre el ovario del ser humano muestra que el DMSO, el 1,2-Propanediol (PROH) y el EG, son mucho más efectivos que el glicerol. Aunque químicamente el glicerol es poco tóxico, puede no ser muy efectivo para la

criopreservación ovárica por su lenta penetración y su alto estrés osmótico (Demirci y cols., 2001; Kim y cols., 2001).

Los índices de sobrevivencia de los folículos primordiales congelados con DMSO, EG y PROH tienen un rango de entre 44 % y 84 %, comparados con folículos preservados con glicerol (10 %) que resulta ser un crioprotector muy pobre (Picton y cols., 2002; Oktay y cols., 2000 y 2001). Demirci y cols. (2001), reportan que con una concentración de 2 M de DMSO se obtienen condiciones óptimas para la sobrevivencia de folículos primordiales de oveja, aunque Gutiérrez y cols. (2001), sugieren que el DMSO y el PROH tienen similares resultados en cuanto a su acción crioprotectora en concentraciones de 1.5 M. Sin embargo, se ha observado que utilizando glicerol al 15% y un congelamiento lento, un total de 80% de folículos son destruidos con este proceso (Yuksel, 2000).

2.4 Protocolos de congelación y descongelación

Si bien, las células congeladas y almacenadas a una temperatura de -196° C pueden mantener su viabilidad por muchos años, la velocidad con la cual son congeladas y descongeladas es crucial para su supervivencia (Kim y cols., 2001). Los protocolos de CTO actuales, se basan en las técnicas de congelación de embriones, aunque se ha descubierto que utilizando un protocolo de congelación lento se obtienen mejores índices de sobrevivencia folicular (Demirci y cols., 2001). En estos protocolos de congelación se incluye un "seeding" inducido. Se denomina seeding al proceso mediante el cual comienza la formación de cristales de hielo en la solución al iniciarse el descenso de la temperatura (Shaw y cols., 2000), y es un proceso necesario para minimizar las variaciones de temperatura al momento de la formación del hielo (Demirci y cols., 2003).

Por otro lado es importante mencionar que no existe una gran diferencia morfológica entre los folículos primordiales de los mamíferos, por lo que el mismo

protocolo simple de criopreservación puede ser utilizado en diferentes especies (Shaw y cols., 2000).

El protocolo de congelación utilizado por Demirci y cols. (2001) para criopreservar tejido ovárico de oveja es el siguiente:

1. De 10° C a -7° C a una velocidad de 2° C/ minuto.
A la temperatura de -7° C se realiza un seeding semiautomático realizado por el criocongelador mediante la liberación de calorías negativas.
2. De -7° C a -35° C a una velocidad de 2° C/ minuto.
3. De -35° C a -140° C a una velocidad de 25° C/ minuto.
4. De -140° C se transfieren los viales a nitrógeno líquido a una temperatura de -196° C hasta su descongelación.

La descongelación se realiza rápidamente a 37° C lavando el tejido ovárico por 5 minutos en medio Leibovitz L-15 libre de crioprotectores.

Nisolle y cols. (2000), manejan el siguiente protocolo de congelación para la CTO en ratones y Qu y cols. (2000), utilizan el mismo protocolo de congelación para la CTO en el ser humano:

Comienza enfriando de 0° C a -8° C a una velocidad de -2° C/ minuto. Se realiza un "seeding" manual tocando el vial con unas pinzas previamente sumergidas en nitrógeno líquido. Continuando el congelamiento hasta -40° C a una velocidad de -0.3° C/ minuto. Para después bajar la temperatura hasta -150° C a una velocidad de -30° C/ minuto. Posteriormente se transfiere a nitrógeno líquido.

La descongelación se realiza poniendo el vial criogénico a temperatura ambiente por 2 minutos y sumergiéndolo posteriormente en agua a 37° C por 2 minutos y lavándolo tres veces en medio Leibovitz sin crioprotector para eliminar este último.

Otro protocolo es el propuesto por Gosden y cols.(1994), en el cual se utiliza una curva descendiente de 2° C por minuto hasta -7° C donde se realiza un seeding manual, después se baja la temperatura a una velocidad de 0.3° C por minuto hasta los -40° C, para su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido a -196° C. La descongelación para este protocolo se realiza exponiendo el vial a temperatura ambiente por dos minutos seguido de dos minutos en baño María a 37° C.

Aunque aparentemente existen varios protocolo de criopreservación para tejido ovárico, todos se refieren en general a un solo protocolo de congelación el cual tiene un ritmo lento, bajando la temperatura alrededor de 0.3-0.5° C por minuto con un "seeding" entre los -6 y -9° C.

Otro método para la CTO es la vitrificación, el cual puede ser un método alternativo y más rápido para criopreservación de tejidos. La vitrificación se define como la solidificación de una solución, no provocado por la cristalización, sino por una elevación extrema de la viscosidad durante la congelación (Massip, 2001). Sugimoto y cols. (2000), utilizan el siguiente protocolo de congelación por vitrificación:

La solución crioprotectora se hizo en medio PBS más 20.5 % de DMSO, 15.5 % de acetamida, 10.0 % de PG y 6.0 % de Polietilén Glicol (solución al 100 %), y haciendo diluciones de esta solución al 12.5, 25 y 50 % (V/V), se expone el tejido ovárico a temperatura ambiente (20 a 25° C) por 5 minutos en la dilución al 12.5 %, seguido de 5 minutos en la dilución al 25 %, 15 minutos con la dilución al 50 % enfriándose en agua con hielo, después el tejido se transfiere a un vial criogénico con una pequeña cantidad de solución al 100 %, siendo introducido directamente en nitrógeno líquido.

La descongelación se realiza rápidamente de la siguiente forma:

1. Se agita vigorosamente la muestra en agua con hielo.
2. Se adiciona 1 ml de solución crioprotectora antes descrita al 50 % y se transfiere a una caja de cultivo en agua con hielo por 10 minutos.
3. El tejido se pasa a una caja con solución al 25 % por 10 minutos y en agua con hielo.
4. El tejido se introduce a la solución al 12.5 % y se expone a temperatura ambiente por 10 minutos.
5. Finalmente se lava con solución libre de crioprotectores.

2.5 Evaluación del tejido ovárico postdescongelado

La evaluación de la viabilidad del tejido ovárico postdescongelado se puede realizar por medio de análisis histológicos (Salle y cols. 1998, Demirci y cols. 2001 y Sigimoto y cols. 2000). En este proceso el tejido se embebe en parafina, se realizan cortes para obtener láminas delgadas de entre 5 y 10 μm y se tiñe con hematoxilina y eosina, estos cortes se observan al microscopio para observar si hay indicios de desorganización celular y autólisis (Sigimoto y cols. 2000, Abbasian y cols. 2001, Salehnia y cols. 2001, y Salle y cols. 1998).

Para observar la sobrevivencia de folículos contenidos en el tejido ovárico descongelado, se pueden utilizar tinciones supravitales como el azul tripán (0.4 %), con esta tinción los folículos muertos se tiñen de azul y los vivos no se tiñen (Bedaiwy y cols., 2003; Demirci y cols. 2001)

2.6 Transplante del tejido

Ya desde 1958 fue posible obtener descendencia viva, después del transplante ortotrópico (transplante en el pedúnculo ovárico o dentro de la bolsa ovárica) de ovarios frescos en el ratón, lo cual es un paso importante que precede a la congelación de tejido ovárico (Yuksel, 2000). En base a esto, se han sugerido algunas estrategias para restituir la fertilidad utilizando tejido ovárico

criopreservado. Una de estas estrategias involucra la trasplantación autóloga ortotrópica o xenogenética del tejido descongelado y posterior monitoreo del desarrollo potencial y la dinámica folicular *in vivo*. En 1998 Salle y col. lograron criopreservar fragmentos de tejido ovárico ovino sin ocasionar daño a los folículos, y demostraron que con el tejido ovárico ovino congelado y autotransplantado se puede lograr la secreción de progesterona y la maduración endometrial. Se sabe que antes de que el tejido trasplantado se revascularice, su sobrevivencia depende de la difusión de nutrientes que pueda captar de su alrededor, por lo que puede haber pérdida de folículos antes del establecimiento del tejido (Newton y cols., 1996).

Por otro lado, en la mayoría de las especies la reimplantación intra-abdominal de tejido ovárico puede ser poco deseable comparado con el reimplante en otro sitio cuando se busca recuperar o evaluar el tejido, por lo que la localización subcutánea sobre la fascia del músculo de escápula ofrece la ventaja de fácil accesibilidad. Durante esta técnica de reimplantación, la anestesia general no es requerida ya que al realizarse una pequeña incisión se puede utilizar anestesia local en el animal ligeramente sedado, por lo cual el tejido puede ser fácilmente removido o más tejido ovárico puede ser implantado cuando la reserva de ovocitos es baja. Finalmente esta técnica es poco complicada, comparada con el trasplante ortotópico y no requiere laparoscopia o laparotomía (Oktay y cols., 2003).

Otra forma de trasplante es el xenotrasplante, el cual se define como el trasplante de tejido de una especie a otra diferente (Bosch y cols., 2003). Desde 1960 se ha investigado este tipo de trasplantes, con el objetivo de proveer órganos de primates no humanos al ser humano con falla terminal en algún órgano. Aunque el entendimiento de la inmunología del trasplante y el rechazo se han desarrollado, son la habilidad para manipular el trasplante y la respuesta del

hospedador, los que han llevado a aplicaciones mas amplias para los xenotransplantes (Metcalf y cols., 2001).

Por ejemplo, una mutación en el cromosoma 16 en el ratón con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) previene o retarda la maduración de los linfocitos T y B, esto reduce su capacidad para rechazar el transplante. La función endocrinológica reproductiva y el desarrollo folicular al estadio antral, ha sido reportada en tejido ovárico que ha sido xenotransplantado a ratones SCID proveniente de ovino, gata y mono tití (Paris y cols., 2004), además del ser humano (Gook y cols., 2001).

El xenotransplante debajo de la cápsula del riñón tiene el potencial para proveer un buen aporte vascular sanguíneo, debido a que se estima recibe el 10% de la sangre que sale del corazón. Las mayores razones para seleccionar al riñón como órgano hospedador son, una alta concentración de factores angiogénicos y la facilidad para transplantar, recuperar e identificar el tejido transplantado. Otra posibilidad es el alotransplante el cual se define como el transplante de un tejido a otro individuo de la misma especie, sin embargo este método no se ha utilizado tan ampliamente como el autotransplante y el xenotransplante (Paris y cols., 2004).

2.7 Cultivo *in vitro* de tejido y folículos

El desarrollo de tecnologías para madurar los ovocitos de folículos más pequeños, después del almacenamiento por largo tiempo a bajas temperaturas, es teóricamente una solución atractiva. La extensión de tiempo de crecimiento de folículo primordial a un folículo de Graaf y los cambios en los requisitos de las células, interacciones celulares, morfogénesis y el simple aumento de tamaño en la formación del antro son los mayores desafíos para la tecnología de cultivo de células (Picton and Gosden, 2000).

El objetivo del cultivo *in vitro* de folículos es mimetizar los procesos ocurridos *in vivo*, sin embargo el primer obstáculo para el cultivo de folículos de mamífero es que al recobrarlos se utiliza una digestión enzimática, estos folículos presentan solo algunas células de la teca y daño en la membrana basal. Alternativamente se han recuperado folículos por medio de disección mecánica, aunque el número recuperado es menor que con la técnica enzimática (Cecconi, 2002). Por otro lado durante el cultivo, se ha observado en folículos del ser humano la formación del antro solo cuando se le adiciona FSH y, un diámetro folicular mayor se ha obtenido cuando se adiciona LH y FSH al medio de cultivo (Smits and Cortvrindt, 1998). Gutiérrez y cols. (2000), trabajando con folículos de bovino obtuvieron la formación de folículos antrales a partir de folículos preantrales adicionando al medio de cultivo FSH, factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento parecido a la insulina; además, se mantuvo la morfología y la organización celular de los folículos por un periodo de cultivo largo.

El proceso de la foliculogénesis completa *in vitro* se ha reportado únicamente en el ratón, el cual abarcó desde el cultivo de folículos primordiales seguidos de maduración y fertilización del ovocito y culminó con la obtención de crías vivas. Aunque esta experiencia no se ha repetido en otros mamíferos marca la posibilidad de lograr el proceso de foliculogénesis *in vitro* exitosamente (Eppig and O'brien, 1996).

En la actualidad, aparentemente la mejor estrategia es la iniciación del crecimiento folicular *in situ* seguido del aislamiento de los ovocitos o de los folículos que tengan un desarrollo preantral o antral (Picton and Gosden, 2000; Liu y cols., 2000). Aunque la maduración y cultivo *in vitro* de folículos primordiales aislados de tejido ovárico descongelado puede ser una alternativa para la obtención de gametos fértiles, aún existe una gran variabilidad en cuanto a los resultados de estas técnicas (Hartshome, 1997)

3. JUSTIFICACIÓN

Los ovarios de un cánido en peligro de extinción podrían ser recuperados para salvaguardar el material genético por medio de la criopreservación. La perra doméstica se utilizó como modelo experimental para la implementación de esta técnica, además de que al no existir una gran diferencia morfológica de los folículos primordiales entre especies, es posible utilizar protocolos de criopreservación ya establecidos.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la técnica de criopreservación del tejido ovárico de caninos domésticos.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Congelar tejido ovárico, evaluando la sobrevivencia folicular antes y después del proceso de congelación.

Evaluar la reimplantación del tejido ovárico criopreservado en la misma perra de la que se obtuvo.

5. HIPÓTESIS

Los folículos preantrales en un trozo de corteza ovárica canina, pueden sobrevivir a los procesos de criopreservación, descongelación y autotransplante utilizado una metodología ya establecida en otras especies

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de embriones y de cultivos celulares del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México y se dividió en dos fases. La primera fase estuvo encaminada a evaluar la supervivencia folicular después de la criopreservación y la descongelación de tejido ovárico canino. La segunda fase se enfocó a evaluar la supervivencia folicular después de la criopreservación-descongelación y reimplantación de tejido ovárico a nivel de la escápula.

6.1 Efecto de la congelación de corteza en la supervivencia de folículos ováricos.

6.1.1 Obtención de los ovarios.

Se trabajaron 30 muestras de tejido ovárico. Los ovarios se obtuvieron de perras a las cuales se les practicó ovariectomía y/o que fueron destinadas al sacrificio por razones no relacionadas con este trabajo. Todas las perras fueron de raza criolla excepto una perra de raza mastín napolitano de 8 años de edad. Los ovarios se colectaron y transportaron en medio Dulbecco (PBS) suplementado con 100 U.I./ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina a una temperatura de 4° C para minimizar la isquemia. La edad de las perras se determinó por medio de la dentición (Holmstron y cols., 1998) y el estado reproductivo se determinó por medio de citología vaginal y observación directa de las estructuras presentes en el ovario (folículos, cuerpos lúteos, etc.) (Durrant y cols., 1998).

6.1.2 Obtención de Corteza Ovárica.

Los ovarios se lavaron dos veces con el mismo medio de transporte. Se obtuvieron muestras de la corteza ovárica de 5x5x2 mm (Jeremias y cols., 2001) las cuales se introdujeron en medio TCM-199 suplementado con 10 % de Suero

Fetal Bovino (SFB). De cada animal se obtuvieron por lo menos 4 trozos de corteza ovárica. En un trozo ovárico se evaluó la viabilidad de los folículos inmediatamente después de su extirpación y los restantes se congelaron. La sobrevivencia folicular después de la descongelación se evaluó en otro corte y los restantes fueron destinados a la reimplantación. Además, por cada muestra se congeló también un control negativo con el mismo procedimiento de congelación pero sin crioprotector.

Los fragmentos utilizados para la criopreservación se incluyeron en 1.5 ml del mismo medio suplementado con SFB más 1.5 M de DMSO y fueron almacenados en viales criogénicos (Demirci y cols., 2001)

6.1.3 Congelación.

La criopreservación se realizó con la ayuda de un criocongelador automático CryoLogic CL-8000 a base de nitrógeno líquido, de acuerdo al siguiente protocolo de congelación según Gosden y cols. (1994):

La temperatura fue descendiendo gradualmente de 0° C a -7° C a una velocidad de 2° C/ minuto. A -7° C se realizó un "seeding" manual sumergiendo unas pinzas en nitrógeno líquido y tocando con estas el vial, manteniéndose a esta temperatura por 9 minutos. Posteriormente la temperatura bajó paulatinamente de -7° C a -40° C a una velocidad de 0.3° C/ minuto, seguido de una reducción de la temperatura de -40° C a -100° C a una velocidad de 4° C/ minuto. Cuando llegó a -100° C los viales se transfirieron directamente a nitrógeno líquido a -196° C, a esta temperatura permanecieron por una semana hasta su descongelación.

Para descongelar el tejido ovárico, los viales se extrajeron del nitrógeno líquido y fueron expuestos a temperatura ambiente por 2 minutos para evaporar el nitrógeno líquido que se hubiera introducido al vial, seguido de 2 minutos en baño

maría a 37° C. Para eliminar el crioprotector, los fragmentos ováricos fueron transferidos a medio PBS fresco suplementado con 10% de SFB por 5 minutos.

6.1.4 Viabilidad

La sobrevivencia folicular se evaluó después de la disección de los folículos de forma mecánica, tanto en tejido fresco como en tejido postdescongelado, con la ayuda de una hoja de bisturí y con agujas calibre 27 G (0.40mm X 13mm) bajo el microscopio estereoscópico. El tejido fue seccionado en pequeñas fracciones para observar los folículos individualmente, únicamente se utilizaron folículos preantrales. Los folículos se examinaron usando un microscopio invertido (a 400x) y realizando una tinción de los folículos, con una solución de azul de tripán al 0.4 % a temperatura ambiente contando los folículos teñidos (muertos) y no teñidos (vivos). Por cada fragmento se contaron por lo menos 50 folículos y se examinaron únicamente los folículos intactos. Este procedimiento se realizó antes y después de la congelación, todos los ovarios se trabajaron durante las primeras 1.5 horas posteriores a su obtención.

6.2 Efecto de la congelación y autotransplante de corteza ovárica en la sobrevivencia y desarrollo folicular.

6.2.1 Animales utilizados para reimplantación del tejido ovárico

Se utilizaron 5 perras sanas con ambos ovarios, las perras fueron alojadas en jaulas individuales con agua a libre acceso y se les proporcionó una dieta balanceada con alimento comercial. La ovariectomía bilateral se les realizó bajo anestesia general. Las secciones de corteza ovárica fueron procesadas mediante el protocolo de criopreservación de tejido ovárico que se describió anteriormente, a excepción de que el tejido ovárico fue seccionado en trozos mas grandes de 10x5x2 mm para una mejor identificación. Los viales fueron rotulados con la clave asignada a cada una de las perras para su identificación.

6.2.2 Procedimiento de reimplantación

Bajo sedación con 5mg/kg de Ketamina y lidocaína como anestésico local se realizó una incisión de aproximadamente 3.0 cm. sobre la piel que cubre la escápula. Usando unas tijeras de disección se hizo una bolsa entre la fascia muscular y el tejido subcutáneo, evitando dañar las venas y arterias más grandes. Las piezas de corteza ovárica fueron descongeladas y colocadas en Medio M-199, suplementado con 20% de SFB, tres piezas fueron destinadas para reimplante y una pieza se utilizó para la evaluación de la sobrevivencia folicular. Para la implantación del tejido ovárico se utilizó hilo Vicryl de 3 ceros intentando pasar la aguja entre el estroma y la corteza ovárica, enseguida la aguja se insertó en el espacio subcutáneo tan profundamente como fue posible y finalmente se pasó a través de la piel introduciendo la pieza cortical en la bolsa subcutánea jalando la sutura, el lado libre del tejido se ancló con un punto de cruz. El propósito de esta sutura era guiar la pieza cortical y fijarla para evitar la superposición de tejido. La incisión se suturo con hilo nylon de 3 ceros y los puntos retirados doce días después, además se aplicó antibiótico durante 4 días para prevenir alguna infección con una solución comercial de ampicilina y estreptomina a dosis de 3.4 mg/kg y 8.4mg/kg respectivamente.

El tejido reimplantado se recuperó a los tres meses mediante el mismo procedimiento de implantación, siendo depositado en una solución de formol al 10 % durante 24 hrs, posteriormente se embebió en parafina para realizar cortes de alrededor de 5 μ m, estos cortes fueron fijados en laminillas y teñidos con eosina y hematoxilina. Los cortes histológicos se observaron para determinar la presencia de folículos y su grado de crecimiento o desarrollo.

6.3 Análisis Estadístico

El efecto de la congelación sobre la probabilidad de sobrevivencia de los folículos preantrales se analizó por medio de regresión logística utilizando el programa estadístico SAS (Gutiérrez y cols., 2000). La regresión logística es el método de análisis adecuado cuando se necesita modelizar una variable respuesta binaria, del tipo presencia o ausencia (1/0 ó si/no) y permite el uso conjunto de covariables de tipo categórico y continuo, proporcionando interpretación biológica a sus parámetros.

El análisis se efectuó en base a los 35 datos obtenidos, tomando en cuenta que cada dato representa 50 observaciones. Se codificó 0 y 1 para ausencia o presencia de respuesta (vivo o muerto) contrastadas con el estado reproductivo (estro, diestro y anestro). Correspondiendo a un ensayo binomial. El resultado se interpretó como la probabilidad de sobrevivencia folicular en futuras observaciones mediante este mismo procedimiento de criopreservación.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados del efecto de la congelación de corteza en la sobrevivencia de folículos ováricos.

Los resultados del porcentaje de folículos vivos antes y después de congelar tejido ovárico se muestra en el cuadro 7.1.1.

Cuadro 7.1.1. Porcentaje de folículos vivos en el tejido ovárico de la perra inmediatamente después de colección y posteriores a su congelación en nitrógeno líquido en medio conteniendo 1.5 M de DMSO, n=35.

Número de muestras	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico fresco (med ± ds)	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico criopreservado y descongelado (med ± ds)	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico congelado sin criopreservador (control negativo) (med ± ds)
35	92.79 ± 6.63 ^a	50.49 ± 9.03 ^b	1.81 ± 2.47 ^c

Superíndice diferente muestra diferencia significativa ($P < 0.05$)

Los resultados observados en el cuadro 7.1.1, muestran que en el caso de la corteza ovárica de la perra doméstica, la sobrevivencia folicular disminuye alrededor del 50 % después de la descongelación utilizando un crioprotector, además de que sin la presencia de una sustancia crioprotectora (control negativo) la mayoría de los folículos no sobreviven a la criopreservación.

El estado reproductivo de estas 35 perras usadas fue el siguientes: esto 4/35 (11.43 %), diestro 10/35 (28.57 %) y anestro 20/35 (60 %). No hubo efecto del estado reproductivo en la sobrevivencia de los folículos pre o postdescongelado (cuadro 7.1.2) por lo que la sobrevivencia folicular es muy similar entre etapas.

Cuadro 7.1.2 Porcentaje promedio de los folículos vivos en el tejido ovárico de la perra en base al estado reproductivo inmediatamente después de su colección, posterior a su descongelación y del control negativo (congelado sin crioprotector).

Estado reproductivo	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico fresco (med ± ds)	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico criopreservado y descongelado (med ± ds)	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico congelado sin criopreservador (control negativo) (med ± ds)
Estro n=4	88.25 ± 4.58	49.93 ± 8.54	0.49 ± 0.98
Diestro n=10	94.56 ± 3.94	47.16 ± 6.30	2.33 ± 3.30
Anestro n=21	92.81 ± 5.49	52.18 ± 10.05	1.72 ± 2.24
Promedio n=35	92.79 ± 6.63	50.49 ± 9.03	1.81 ± 2.47

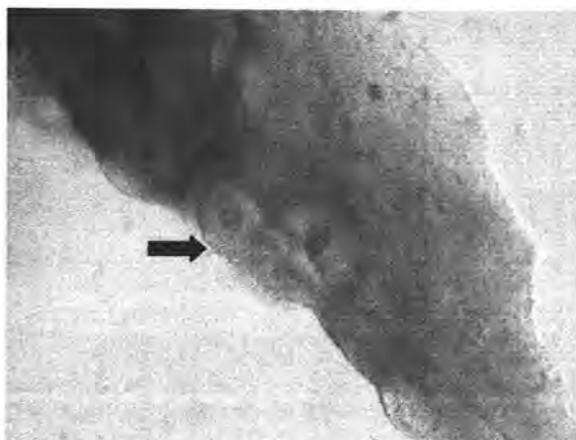


Foto 1 Folículos preantrales de perra en un trozo de corteza ovárica obtenidos mediante disección mecánica. Aumento 100X.



Foto 2 Folículos preantrales de perra rodeados por una capa de células de la granulosa, no se observa la presencia de zona pelúcida. Aumento 100X.

Como se aprecia en las fotografías 1 y 2, la disección mecánica de folículos preantrales se pudo realizar exitosamente sin dañar la morfología del folículo además, al ser comparados con folículos de otras especies se pueden observar muy similares (foto 3).



Foto 3 Folículo preantral de ratón, se puede observar la similitud entre especies. Hartshorne G.M. 1997 Aumento 400X.

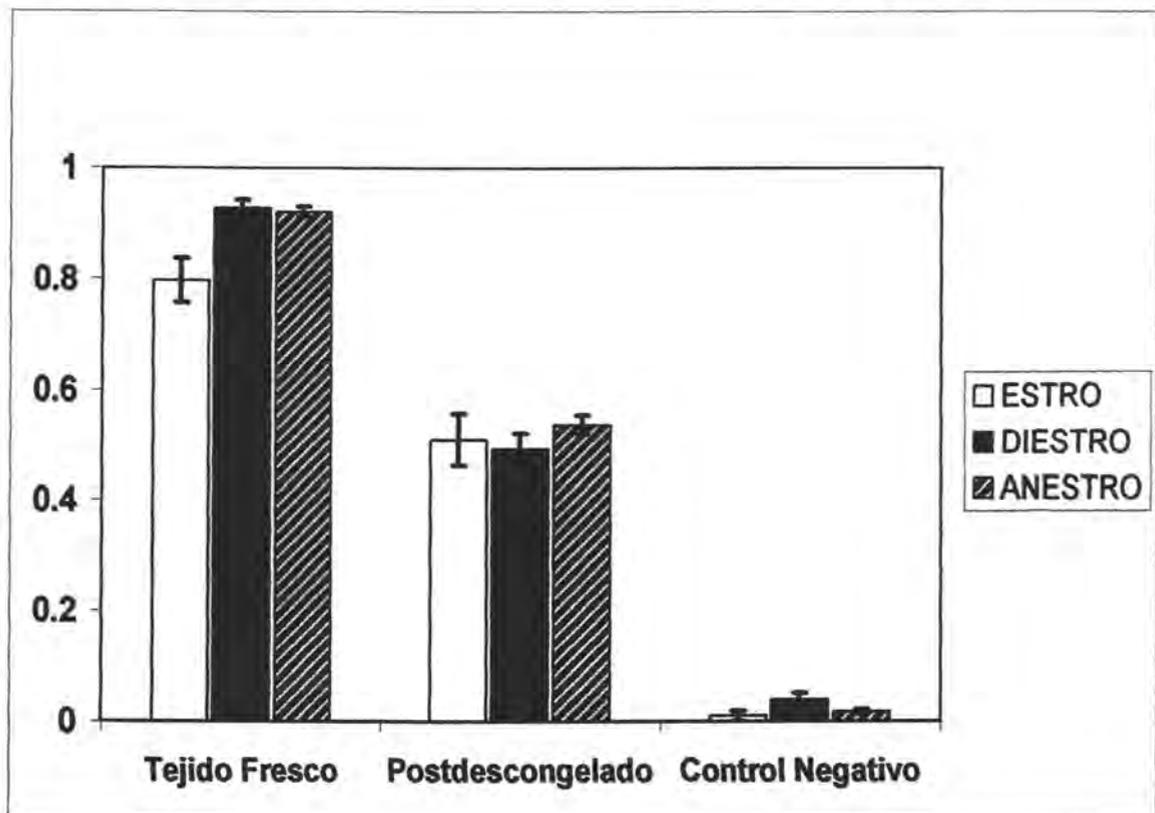
La edad de las perras utilizadas en este trabajo fue la siguiente: menos de un año: 5/35 (14.29%), un año 6/35 (17.14 %), dos años 5/35 (14.29 %), tres años 6/35 (17.14 %), cuatro años 6/35 (17.14 %) y cinco años o más 7/35 (20 %) (cuadro 3). Como se observa en el cuadro 7.1.3, la edad no tuvo efecto alguno sobre la sobrevivencia folicular ni antes de la criopreservación ni después de la descongelación, aunque se observa una mejor sobrevivencia en las edades de <1 hasta 3 años que de 4 años en adelante cuando se utilizó crioprotector.

Cuadro 7.1.3. Porcentaje promedio de los folículos en el tejido ovárico de la perra en base a la edad antes y después de su congelación con y sin crioprotector.

Edad tentativa	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico fresco (med ± ds)	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico criopreservado y descongelado (med ± ds)	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico congelado sin criopreservador (control negativo) (med ± ds)
< 1 año n= 5	92.85 ± 4.17	51.60 ± 4.94	1.15 ± 1.72
1 año n= 6	93.06 ± 3.65	53.49 ± 7.52	1.89 ± 1.69
2 años n= 5	94.64 ± 5.31	49.64 ± 8.70	3.38 ± 2.36
3 años n= 6	92.79 ± 7.08	57.61 ± 10.04	0.96 ± 1.60
4 años n= 6	94.69 ± 5.22	46.37 ± 4.77	0.00
5 años o más n= 7	89.55 ± 11.16	45.18 ± 11.56	3.08 ± 4.09
Promedio n= 35	92.79 ± 6.63	50.49 ± 9.03	1.81 ± 2.47

En el estadio de estro la proporción de folículos vivos (en tejido fresco) es significativamente menor que en los estadios de diestro y anestro. La congelación redujo la cantidad de folículos vivos, pues la probabilidad de sobrevivencia de los folículos preantrales de perra es de alrededor de 50% (gráfica 1).

Gráfica 1. Probabilidad de sobrevivencia de los folículos preantrales obtenida por medio de regresión logística para las etapas de estro, diestro y anestro



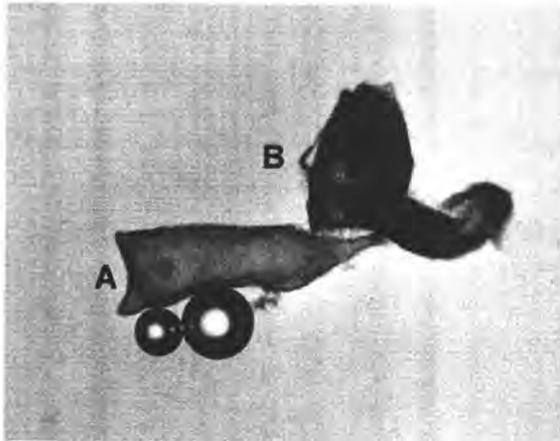


Foto 4. Folículos preantrales vivo (A) y muerto (B) evaluados postdescongelado con una solución de azul tripán al 0.4 %. Aumento original 400X

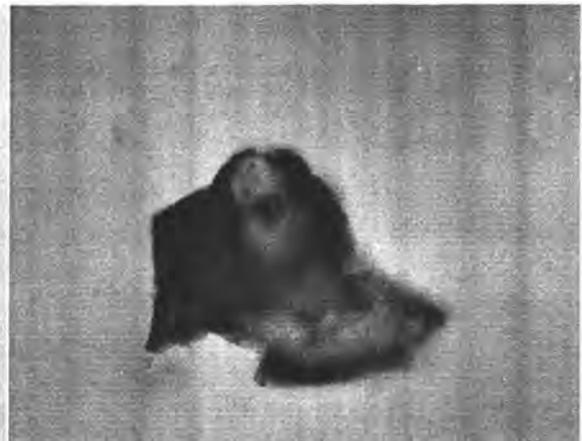


Foto 5. Folículo preantral evaluado postdescongelado con una solución de azul tripán al 0.4%. Teñido (muerto). Aumento original 400X.

La tinción de los folículos preantrales con azul tripán al 0.4% fue efectiva para evaluar la sobrevivencia y distinguir los folículos vivos y muertos como se observa en las fotografías 4 y 5, además el control negativo de cada muestra congelada sin crioprotector, sirvió para probar la eficiencia de esta técnica de evaluación.

7.2 Efecto de la congelación y autotransplante de corteza ovárica en la sobrevivencia y desarrollo folicular.

Se congelaron muestras de corteza ovárica de 5 perras con un promedio de 97.66 ± 1.65 % de folículos vivos antes de congelar de y 44.66 ± 1.34 % postdescongelado. Cuatro de las perras utilizadas se encontraban en diestro y una en anestro. Además sus edades fluctuaron entre 3 y 5 años de edad (cuadro 7.2.1).



Foto 6. Corte histológico del tejido ovárico, en donde se observa un folículo preantral avanzado., Magnificación original 100X.

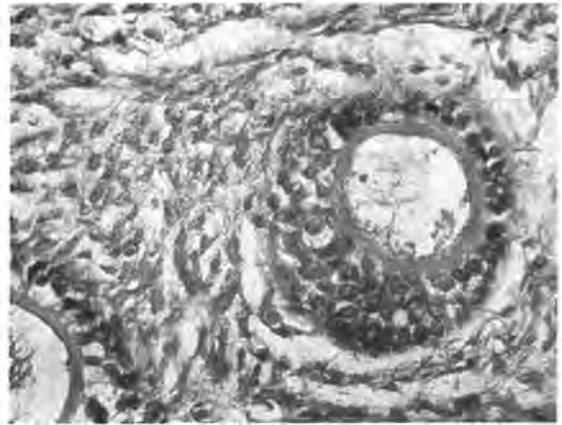
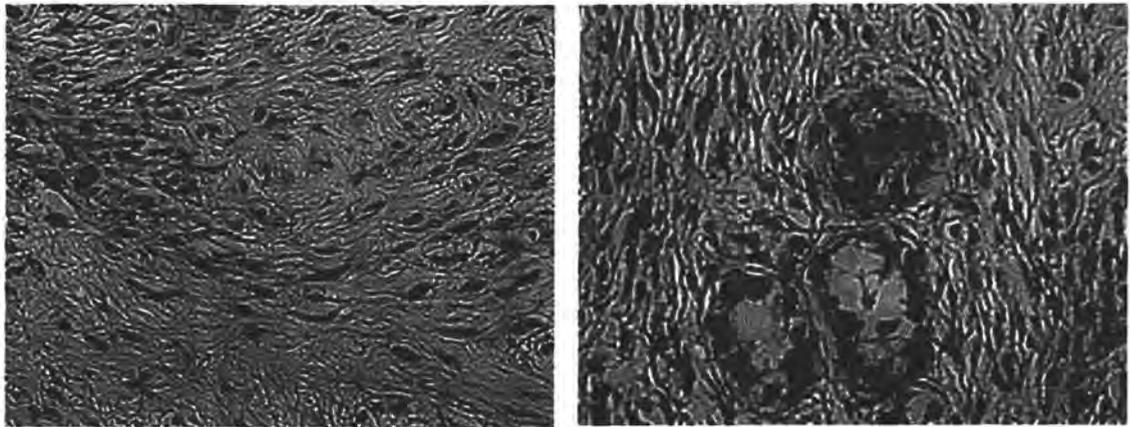


Foto 7. Corte histológico donde se observa un folículo preantral secundario rodeado por una o dos capas de células de la granulosa, Magnificación original 400X.

Se recupero tejido ovárico tres meses después de haber reimplantado en la zona de la escápula en 4 de las 5 perras y en tres de estas 4 perras se determinó la presencia de folículos primordiales, primarios y secundarios (foto 7 y cuadro 7.2.1), además en una perra se encontraron folículos preantrales en un grado avanzado de desarrollo, es decir un folículo que en su interior contenía un ovocito con zona pelúcida formada y rodeado por varias capas de células de la granulosa (Foto 6). No obstante estos hallazgos, ninguna de las perras manifestó signos de estro.

En todos los casos en los que se recupero tejido ovárico se encontró tejido carente de folículos y en apariencia fibroso (foto 8) fue en solo uno de estos casos en la que todo el tejido fue de este tipo, el cual sufrió necrosis y no se implanto correctamente, aunado a esto, en los cortes histológico también se determino la presencia de folículos atresicos lo cuales perdieron su integridad estructural (foto 9).



Fotos 8 y 9 Cortes histológicos de tejido ovárico perra recuperado 3 meses después de haberlo autoimplantado subcutáneamente a nivel de escápula. En la foto 8 se observa tejido sin la presencia de folículos y en apariencia fibroso. En la foto 9 se observa la presencia de folículos atresicos.

Cuadro 7.2.1. Resumen de las características y resultados de las cinco perras utilizadas para la reimplantación subcutánea de tejido ovárico sobre la fascia del músculo de la escápula.

Clave	Edad	Estado Reproductivo	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico fresco	Porcentaje de folículos vivos en tejido ovárico criopreservado y descongelado	Se recupero tejido/ presencia de folículos
NEG	3 años	diestro	100.00	44.00	si/si
CHA	4 años	diestro	98.04	44.00	no/no
DEN	4 años	diestro	96.00	43.14	si/si
NEN	5 años	anestro	98.11	46.15	si/no
LIG	5 años	diestro	96.15	46.00	si/si
Med±ds			97.66±1.65	44.66±1.34	

8. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que durante la criopreservación de tejido ovárico canino y su posterior reimplantación, se conserva la viabilidad de un porcentaje aceptable de folículos. Este es el primer reporte de la utilización de la criopreservación de tejido ovárico (CTO) en la perra o en algún otro canino. Entre los animales de laboratorio en que se ha empleado la CTO, se encuentran la rata (Sugimoto y cols., 2000), el ratón (Cleary y cols., 2001) y el hámster (Yuksel, 2000), animales de vida silvestre como el mono Tití (Candy et al. 1995), el elefante (Gunasena y cols., 1998), el wombat (canguro) (Wolvekamp y cols., 2001) y animales domésticos como la vaca (Paynter y cols., 1999), la borrega (Baird y cols., 1999), la cabra (Rodrigues y cols., 2004), la cerda (Jeremias y cols., 2001) y la gata (Bosch y cols., 2004).

El porcentaje de folículos vivos obtenido en el presente trabajo antes de congelar el tejido ovárico (92.79 ± 6.63) es comparable a lo encontrado por Demirci y cols., (2000) quienes obtuvieron entre 2.2 y 2.8 % de mortalidad folicular trabajando con tejido ovárico de borrega y a lo informado por Rodrigues y cols., (2004) que encontraron un 89 % de folículos preantrales normales de cabra, más aún resultó ser mucho mayor a lo obtenido en la gata con un 42.3 ± 3.5 % de viabilidad folicular (Jewgenow K. y cols., 1998) inmediatamente después de obtener el tejido ovárico.

Después de la congelación y descongelación, el porcentaje de folículos vivos (50.49 ± 9.03 %) resultó estar entre el rango reportado por Oktay y cols., (2001) el cual es de 44%–84% de sobrevivencia folicular para varias especies. Se encontró una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el porcentaje de folículos vivos antes y después del proceso de congelación-descongelación. Sin embargo, existe una gran variación en los resultados encontrados en diferentes especies, la sobrevivencia folicular post descongelado en la borrega fue de 92 % (Demirci,

2001), en contraste con 19 % en el caso de la gata (Jewgenow y cols., 1998). Es importante mencionar que los folículos antrales no sobreviven tan bien como los folículos preantrales, esto puede ser atribuido a que estos últimos tienen un tamaño pequeño, una baja tasa metabólica y que por su localización periférica en el tejido permite de una mejor penetración del crioprotector, es por eso que en este trabajo solo se tomaron en cuenta los folículos preantrales (folículos primordiales, primarios y secundarios). Por otro lado, se ha descrito que la criopreservación de ovocitos se torna problemática en el caso de los ovocitos de mamíferos con alta concentración de lípidos intracitoplasmáticos (ver anexos foto 11.1.2) (Leibo and Songsasen, 2002), dicha cantidad de lípidos puede influenciar la sensibilidad a bajas temperaturas durante la criopreservación (Ledda y cols., 2001). En el caso de la perra se ha reportado que los ovocitos dentro de un folículo preantral ya presentan una alta concentración lipídica intracitoplásmica (Durrant y cols., 1998), es probable que la presencia de estos lípidos haya contribuido a que la sobrevivencia folicular postdescongelado no fuera mayor. Con los resultados obtenidos referentes al porcentaje general de folículos vivos se puede decir que bajo las condiciones del presente trabajo la muerte folicular que se presentó en el ovario de los caninos después de la descongelación fue de alrededor del 50 %, lo cual concuerda con lo afirmado por Rimón y cols. (2003) quienes señalaron que entre un 40-50 % del tejido preservado sufre daño después de la congelación y descongelación.

La edad no tuvo un efecto sobre el porcentaje de folículos vivos postdescongelado ni antes de congelar (cuadro 7.1.3). El número de folículos al nacimiento es de alrededor de 100,000 por ovario en la perra, pero declina a tan solo 1560 a los 8 años de edad (Andersen and Simpson, 1973), lo que hace pensar que el mejor momento para recuperar y congelar tejido ovárico podrían ser los primeros años de vida del animal, no obstante los ovarios de perras prepúberes (menores a un año) generalmente contienen algunos folículos preantrales y antrales tempranos y un porcentaje de folículos degenerados más

alto que en perras de mayor edad, esto puede comprobar la acelerada tasa o proporción de atresia en los primeros meses después del nacimiento en la perra doméstica (Durrant y cols., 1998). Por otro lado, se ha demostrado que la mejor época reproductiva en la perra se encuentra en el 3er año de edad (Blythe and England, 1993) y que la fertilidad de la perra decrece después de los 7 años de edad. En este estudio el mejor porcentaje en promedio en cuanto a folículos vivos post descongelado se obtuvo en el grupo de 3 años (57.61 ± 10.04 %) y el mas bajo se encontró en el grupo de 5 años o más (45.18 ± 11.56), en este último grupo se incluyó una perra de 8 años la cual tuvo el más bajo porcentaje de folículos vivos postdescongelado de todas las perras (26.00 %), esto podría evidenciar lo afirmado por Blythe y England. Aunque se ha manejado que la colección de tejido ovárico no depende de la edad o estado reproductivo, la cantidad y calidad de los folículos dentro del tejido podría afectar los resultados de la congelación.

Al igual que con la edad, el estado reproductivo no tuvo efecto sobre el porcentaje de folículos vivos postdescongelado, sin embargo de acuerdo con la predicción del modelo de regresión logística (gráfica 1) se observó una diferencia significativa en el porcentaje de folículos vivos antes de congelarlos, entre el estado de estro y los estados de diestro y anestro, pero no entre estos dos últimos. Los altos niveles de gonadotropinas (FSH y LH) circulantes durante el estro en la perra (Concannon P.W., 1993), pueden estar estimulando continuamente el crecimiento de ovocitos en folículos preantrales y como se vió anteriormente, estos folículos pueden ser mucho mas sensibles a las bajas temperaturas, causando una baja viabilidad. Además se pudo observar que la probabilidad de la sobrevivencia folicular es de alrededor del 50% postdescongelado en cualquier etapa del ciclo reproductivo de la perra.

Aunque en esta investigación no se tuvo acceso a perras de diferentes razas, la perra con el mas bajo porcentaje de folículos vivos postdescongelado

(26.0 %) resultó ser la de mayor edad y la única de raza pura (Mastín Napolitano). Durrant y cols. en 1998, encontraron que se podía aislar un mayor número de folículos de los ovarios de perras criollas que de perras de raza pura, dando como explicación que la selección por largo tiempo o muy intensa buscando características especiales de raza, podría limitar la variación genética y afectar la sensibilidad ovárica a las gonadotropinas en las perras domésticas. Lo mismo podría pasar con los folículos de ovarios de especies caninas en peligro de extinción, los cuales pueden encontrarse en números reducidos exhibiendo una diversidad genética disminuida. Por otro lado, se podría esperar una gran diversidad de estados en cuanto a edad y estado del ciclo estral en la colección *postmortem* de ovarios en especies exóticas o en peligro.

La presencia de una sustancia crioprotectora es imprescindible durante la congelación, como lo demuestra el porcentaje de folículos vivos obtenido en las muestras congeladas sin crioprotector la cual fue 1.81 ± 2.47 %. El crioprotector debe ser capaz de penetrar fácilmente al interior de las células para que ejerza su efecto crioprotector. El DMSO es de los crioprotectores más ampliamente utilizados (Salle y cols., 2003; Cleary y cols., 2001; Nisolle y cols., 2000; Gutiérrez y cols., 2000; Jewgenow y cols., 1998), y resulta ser más benéfico para congelación de corteza ovárica de oveja que el PG (Demirci B. y cols., 2001). Aunque el glicerol se ha empleado durante mucho tiempo en los procesos de criopreservación embrionaria, ha resultado ser un crioprotector pobre para el tejido ovárico (Rodríguez y cols., 2004; Yuksel, 2000).

La colección de ovarios fuera de las condiciones de laboratorio, puede ser difícil y comúnmente existe un lapso de tiempo prolongado entre la muerte de animal y la colección. En el presente trabajo, los ovarios se obtuvieron inmediatamente después de la muerte del animal y no pasaron mas de 1.5 hrs desde su obtención hasta que se procesaron para su criopreservación, Se ha reportado en el ratón que el número de folículos vivos decrece alrededor del 50 %

dentro de las tres primeras horas posteriores a la muerte y aunque no se ha observado alguna diferencia entre las 3 y las 6 horas después de la colocación de los ovarios en PBS a temperatura ambiente, después de 12 hrs. se encontró una reducción significativa en la supervivencia folicular (Cleary M. y cols., 2001). Por otro lado, cuando los ovarios permanecen en el cuerpo del animal, se ha observado una marcada reducción en la sobrevivencia folicular antes de las 3 hrs *post mortem*. Esto puede ser debido a que el tejido ovárico es expuesto a una isquemia extrema, o la peroxidación de los lípidos, necrosis, o al daño por radicales libres de oxígeno, por ello la remoción inmediata de los ovarios y su transporte y almacenamiento en PBS es crítico. Por otra parte, también se recomienda su transporte a una temperatura de refrigeración (4° C) (Demirci y cols., 2001; Nisolle y cols., 2000), como se hizo en este trabajo, ya que al bajar la temperatura también baja el metabolismo del tejido, ayudando a minimizar la isquemia. Además, en el caso del ser humano se ha demostrado que el transporte en hielo hasta por 4 hrs. de la corteza ovárica aislada permite la sobrevivencia de folículos primordiales (Schmidt y cols., 2003).

El protocolo de congelación utilizado en esta investigación ha sido utilizado para otras especies (Bosch y cols., 2004; Rodrigues y cols., 2004; Wolvekamp y cols., 2001; Jewgenow y cols., 1998; Gosden y cols., 1996). El porcentaje de folículos preantrales vivos postdescongelado logrado en la presente investigación (50.49 ± 9.03 %) resulta ser aceptable y corrobora que no existe una diferencia muy grande entre los folículos primordiales de los mamíferos. Por lo tanto parece ser que un mismo protocolo de congelación puede ser empleado para criopreservar tejido ovárico de varias especies como el ratón, la oveja, wombat etc. Sin embargo sería necesario probar distintos métodos de congelación, para determinar cual es el más apropiado para los ovarios de canino.

Por otra parte, se ha observado que el tamaño de tejido a congelar puede afectar el resultado de la criopreservación. Los fragmentos de 5x5x2 de tejido

ovárico canino utilizados en el presente trabajo resultaron ser apropiados para obtener una viabilidad folicular aceptable ($50.49 \pm 9.03 \%$). Se sabe que la criopreservación de ovarios completos en el caso del ratón, ha tenido buenos resultados, esto se debe aparentemente al pequeño tamaño de estos, sin embargo en especies con ovarios más grandes, la distancia relativa de las células en el interior del ovario y el exterior afecta el ritmo al cual estas células se enfrían. Por esto, la criopreservación de pequeñas piezas de entre $1-2 \text{ mm}^2$ de corteza ovárica se consideraba técnicamente necesaria. Sin embargo, Jeremias y cols., (2003) sugieren que la criopreservación se debe hacer con piezas de tejido ovárico más grandes, de alrededor de 5 mm^2 , pues fracciones más pequeñas pueden estar sujetas a un mayor daño mecánico. No obstante se ha demostrado que se puede criopreservar el ovario completo con una razonable viabilidad del tejido ovárico de oveja (Bedaiwy y cols., 2003).

La presencia de folículos primordiales, primarios y secundarios en el tejido ovárico recuperado 3 meses después del autotransplante en tres de las 5 perras, indica que el tejido se revascularizó correctamente y que es posible que algunos folículos puedan permanecer viables durante todo el procedimiento de congelación, descongelación y transplante. Estudios mas detallados han demostrado que alrededor del 28% de los folículos primordiales sobreviven a la criopreservación descongelación y transplante en los ratones SCID y que solo el 35% de los ovocitos sobrevive al transplante en el caso del tejido fresco (Hunter y cols., 2004). Lo importante de los folículos primordiales es que, al parecer son poco vulnerables al daño criogénico comparado con los folículos grandes, ello debido a su pequeño tamaño y a su baja actividad metabólica (Picton y cols., 2002) lo que les confiere mas resistencia a la nociva deprivación que ocurre durante la implantación, ya que el tejido reimplantado depende en un principio de los nutrientes que se encuentren a su alrededor antes de que se revascularice. Por otro lado, en solo una perra de las 5 a las que se les realizó este procedimiento, se encontró un folículo antral lo que sugiere que el tejido ovárico

estaba reasumiendo su funcionamiento. El desarrollo de folículos antrales en tejido criopreservado y trasplantado ya se ha observado con anterioridad en tejido de gata y de tití. Aunque en el presente estudio no se determinaron niveles hormonales de gonadotropinas (FSH y LH), se sabe que en los mamíferos el crecimiento de un folículo primordial ocurre sin la necesidad de gonadotropinas y es hasta el estadio antral cuando se vuelve dependiente de estas (Picton, 2001). Los folículos antrales se han aislado incluso de perras prepúberes (menores a seis meses), donde los niveles de FSH y LH son comparables a los de perras adultas en anestro. Además se ha reconocido que en una perra a la cual se le han retirado los ovarios, los niveles de FSH y LH se elevan y se mantienen altos debido a que ya no existe la retroalimentación negativa de las gónadas (Concannon, 1993; Olson y cols., 1992)

El hecho de que en una de las perras no se recuperó tejido y en otra, aunque se recuperó tejido, no se encontró ningún folículo, habla de que hubo errores a lo largo del proceso de reimplantación y establecimiento del tejido, ya que el porcentaje de folículos postdescongelado de estas perras en particular fue similar al de las demás. La pérdida folicular en el tejido transplantado posiblemente se debió a la reabsorción del tejido, degeneración, necrosis (del tejido en su conjunto o en folículos individuales) o incluso a fallas en la técnica quirúrgica, aunado a la isquemia inicial cuando el tejido aun no tiene aporte sanguíneo (Sztein y cols., 2000), ya que la revascularización se da entre los primeros 2 a 7 días (Oktay y cols., 2003; Weissman y cols., 1999).

El tamaño del tejido recomendado para la CTO puede ser de 5x5x2 mm, sin embargo cuando se busca reimplantar dicho tejido se utilizan trozos mas grandes (10x5x2 mm) para poder localizarlos mas fácilmente, aunque se sabe que las piezas ováricas de mayor tamaño tienen el inconveniente de ofrecer una mayor superficie, con lo que el crioprotector no penetra tan bien como en piezas de

menores dimensiones, esto pudo contribuir a que en algunos casos no se encontraran folículos e incluso que no se recuperara tejido ovárico.

Si bien es preferible realizar el trasplante en el pedúnculo ovárico, con el fin de reestablecer la capacidad fértil de la hembra, o en un lugar mucho más irrigado como lo es el riñón, también es deseable situar el trasplante en un lugar mucho más práctico, para monitorear o evaluar el desarrollo del implante sin tener que penetrar a cavidad abdominal. En el presente trabajo se optó por realizar el implante subcutáneamente en la zona de la escápula, por ser un lugar de fácil acceso y relativamente bien vascularizado. Asimismo, ya se tenían reportes de la efectividad del trasplante alojándolo subcutáneamente (Oktay y cols., 2003; Weissman y cols., 1999), sin embargo los hallazgos de Hernández-Fonseca y cols., (2004) demuestran que si existen diferencias entre el sitio del trasplante ya sea en la cápsula del riñón o subcutáneamente.

Desde hace tiempo se tiene conocimiento de procedimientos que involucran trasplante de tejido ovárico en cánidos. El primer informe de tejido ovárico canino alotransplantado fue en el ligamento ancho dentro de la bolsa, lo que terminó en preñez, esto fue registrado en 1899 (Silva y cols., 2004). Metcalfe y cols., (2001) consiguieron xenotransplantar tejido ovárico canino a la cápsula renal de varios ratones inmunodeficientes. El sacrificio de los ratones se realizó después de 56 días, confirmándose el desarrollo folicular, pero no se observó la formación de folículos antrales.

Aunque no se sabe exactamente cuáles son los mecanismos o los estímulos por los cuales se reactiva la actividad reproductiva en la perra, es posible que el bajo número de folículos supervivientes a todo el proceso de criopreservación y reimplantación no sea el adecuado para reestablecer la ciclicidad en alguna de las perras utilizadas en este trabajo, así como el tiempo transcurrido entre el implante y la recuperación no haya sido el adecuado, ya que

en otras investigaciones en el ser humano, fue necesario esperar entre 3 y 4 meses hasta recobrar la función ovárica espontáneamente (Callejo y cols., 2001).

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que los folículos primordiales en la perra domestica pueden sobrevivir a los proceso de criopreservación, descongelación y autotransplante aquí implementados.

La sobrevivencia folicular en el tejido ovárico congelado-descongelado es de alrededor de 50%, además de que este mismo porcentaje de sobrevivencia puede esperarse en futuras observaciones utilizando esta misma metodología.

La edad o el estado reproductivo no tienen efecto alguno sobre la sobrevivencia folicular.

Es posible recuperar tejido ovárico (congelado y descongelado) con la presencia de folículos preantrales, 12 semanas después de haberlo reimplantado en a misma perra de la que se obtuvo.

Por otro lado, son necesarios nuevos estudios en cuanto a los protocolos de congelación, métodos y zona de reimplante para poder asegurar un mayor número de folículos viables y funcionales y poder restablecer la fertilidad de la perra. Además sería necesario incluir en trabajos futuros, un mayor número de muestras ováricas provenientes de animales de raza pura, ya que en esta investigación solo se consiguieron ovarios de perras criollas.

10. LITERATURA CITADA

1. Abbasian E, Salehnia M. and Rezazadeh M. Ultrastructural changes of primary follicles after vitrification of mouse ovarian tissue using ethylene glycol. Abstracts of the 17th annual meeting of the "European Society of Human Reproduction and Embryology", Lausanne, Switzerland 2001 P-147.
2. Andersen A.C. and Simpson M.E. The Ovary and Reproductive Cycle of the Dog (Beagle). Geron-X, Inc. 1973. Los Altos California. 62-104.
3. Aubard Y., Poirot C., Piver P., Galinat S. and Teissier P. Are there indications for ovarian tissue cryopreservation? *Fertil. Steril.* 2001; 76 (2): 414-415.
4. Baird D.T., Webb R., Compbell B.K. Harkness L.M. and Gosden R.G. Long-term ovarian functions in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196° C. *Edocrinology* 1999; 140: No 1: 462-471.
5. Bedaiwy M.A., Jeremias E., Gurunluoglu R., Hussein M.R., Siemianow M., Biscotti C. and Falcone T. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil. Steril.* 2003; 79 (3).
6. Blythe S.A and England G.C.W. Effect of the age upon reproductive efficiency in the bitch. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47. suppl.
7. Bosch P., Hernandez-Fonseca H. J., Miller D. M., Winingger J. D., Massey J. B., Lamb S. V. and Brackett B. G. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology* 2004; 61: 581-594.

8. Callejo J., Salvador C., Miralles A., Vilaseca S., Laila J.M. and Balasch J. Long-Term Ovarian Function Evaluation after Autografting by Implantation with Fresh and Frozen-Thawed Human Ovarian Tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; 86 (9): 4489–4494.
9. Cecconi S. Growth and Differentiation of Small Ovarian Follicles in Mammals: Problems and Future Perspectives. *J. Reprod. Dev.* 2002; 48 (5): 431-445.
10. Cleary M., Snow M., Paris M., Shaw J., Cox S-L., and Jenkin G. Cryopreservation of Mouse Ovarian Tissue Following Prolonged Exposure to an Ischemic Environment. *Cryobiology* 2001;42 : 121–133.
11. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 2334-2338.
12. Concannon P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepuberal female dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47: 3-27 suppl.
13. Durrant B.S., Pratt C.N., Russ K.D. and Bolamba D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 1998; 49 : 917-932.
14. Demirci B., Lornage J., Salle B., Poirel M.T., Guerin J. F., and Frank M. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. *Theriogenology* 2003; 60 : 999–1010.

15. Demirci B., Lornage J., Salle B., Frappart L., Frank M. and Guerin F. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil. Steril.* 2001; 75 (4): 754-762.
16. Eppig J.J. and O'Brien M.J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* 1996; 54: 197-207.
17. Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 2000a; 53: 175-186.
18. Farstad W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 2000b; 60-61: 375-387.
19. Gao D. and Critser J. K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *Institute of Laboratory Animal Research Journal* 2000;41 (4).
20. Gook D.A., McCully B.A., Edgar D.H. and McBain J.C. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting *Hum. Reprod.* 2001; 16 (3): 417-422.
21. Gook D.A., Archer J., Nelson A., Riley C. and McBain J. Histological changes following HCG administration in human cryopreserved ovarian tissue transplanted in immunodeficient mice. Abstracts of the 17th Annual meeting of the "European Society of Human Reproduction and Embryology, Lausanne", Switzerland 2001.
22. Gosden R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000; 163: 125-129.

23. Gosden R.G., Baird D.T., Wade J.C., Webb R. Resoration of fertility in oophorectomised sheep by ovarian autografts stored at 2196°C. Hum. Reprod. 1994; 9: 597–603.
24. Gunasena K.T., Lakey J.R.T., Villines P.M., Bush M., Raath C., Critser E.S., McGann L.E. and Critser J.K. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. Anim. Reprod. Sci. 1998;53 : 265–275.
25. Gunasena K.T., Villines P.M., Critser E.S. and Critser J.K. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. Hum. Reprod. 1997;12 No. 3: 101-106.
26. Gutiérrez A., Corona M.A., Vargas M.A., Méndez-Sashida P., Flores M.S. and Gallardo E. Effect of Cryopreservation on Sheep Ovarian Tissue Comparing Two Cryoprotectants: Dimethylsulfoxide (DMSO) and 1,2-Propanediol. Fertil. Steril. 2000; 74 (3) Suppl. 1 :214-215.
27. Gutierrez C.G., Ralph J.H., Telfer E.E., Wilmut I., and Webb R. Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture In Vitro. Biol. Reprod. 2000, 62; 1322–1328.
28. Hartshome G.M. In vitro culture of ovarian follicles. Rev. Reprod. 1997; 2: 94–104.
29. Hernandez-Fonseca H., Bosch P., Sirisathien S., Winingier J. D., Massey J. B., and Brackett B.G. Effect of site of transplantation on follicular development of human ovarian tissue transplanted into intact or castrated immunodeficient mice. Fertil. Steril. 2004; 81 Suppl. 1: 888-892.

30. Holmstron S.E., Frost P. y Eisner E.R. Técnicas dentales en perros y gatos. Mc Graw Hill Internacional. 2000, México.
31. Hunter M.G., Hudson N., Mitchell M., Walker R.M. and Webb R. Resumption of follicle growth in gilts after ovarian autografting. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 80 (3):4 317–328.
32. Jeremias E., Bedaiwy M. A., Nelson D., Biscotti C. V. and Falcone T. Assessment of tissue injury in cryopreserved ovarian tissue. *Fertil. Steril.* 2003; 79 (3).
33. Jeremias E., Bedaiwy M. A., Margossian H., Biscotti C. V., Sharma R. K. and Falcone T. The importance of ischemia time and tissue size in the preparation of ovarian tissue for cryopreservation. *Fertil. Steril.* 2001; 76(3) Suppl. 1:79.
34. Jewgenow K., Penfold M.L., Meyer H.H.D. and Wildt D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 1998; 112 : 39–47.
35. Kim S. S., Kang H., Lee H-H., Lee H-C., Ko D. and Kim J. A model to assess the protective effect of antioxidants from ischemia after ovarian transplantation. *Fertil. Steril.* 2003; 80, Suppl. 3:144.
36. Kim S.S., Battaglia D.E. and Soules M.R. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertil. Steril.* 2001; 75 (6): 1049-1056.
37. Ledda S., Leoni G., Bogliolo L. and Naitana S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology* 2001; 55 (6): 1359-1371.

38. Leibo S. P. and Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species *Theriogenology* 2002; 57: 303-326.
39. Lieberman B.A., Brison D.R., Critchlow J.D., Smith A.R.B., Russell S.A., Gosden R., Harris M., Shalet S.M. and Radford J.A. Successful restoration of ovarian function using cryopreserved ovarian cortical strips. Abstracts of the 17th Annual meeting of the "European Society of Human Reproduction and Embryology", Lausanne, Switzerland 2001.
40. Liu J., Van der Elst J., Van den Broecke., Dumortier F. and Dhont M. Maturation of Mouse Primordial Follicles by Combination of Grafting and In Vitro Culture. *Biol. Reprod.* 2000;62 : 1218–1223.
41. Massip A., Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Domest. Anim.* 2001 ; April 36 (2):49-55.
42. Metcalfe S.S., Shaw J.M., and Gunn I.M. Xenografting of canine ovarian tissue to ovariectomized severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Reprod. Fertil.* 2001;57 :323-329. Suppl.
43. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum. Reprod.* 1996.11:1487-491.
44. Nisolle M., Casanas-Roux F., Qu J., Motta P. And Doney J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil. Steril.* 2000; 74(1): 122-129.

45. Olson P.N., Mulnix J.A. and Nett T.M. Concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the serum of sexually intact and neutered dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1992; 53 (5): 762-766.
46. Oktay K., Buyuk E., Rosenwaks Z. and Rucinski J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Fertil. Steril.* 2003; 80 (1):193-198.
47. Oktay K., Aydin B.A. and Karlikaya G. A technique for laparoscopic transplantation of frozen-banked ovarian tissue. *Fertil. Steril.* 2001; 75 (6): 1212-1216.
48. Oktay K., Karlikaya G. G., and Aydin B. A. Ovarian cryopreservation and transplantation: basic aspects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000; 169 (1-2):105–108
49. Paris M.C.J., Snow M., Cox S-L. and Shaw J.M. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation?. *Theriogenology* 2004; 61:277–291.
50. Paynter S. J., Cooper A., Fuller B. J., and Shaw R. W. Cryopreservation of Bovine Ovarian Tissue: Structural Normality of Follicles after Thawing and Culture in Vitro. *Cryobiology* 1999; 38: 301–309.
51. Picton H.M., Gosden R.G. and Leibo S.P. Cryopreservation of oocytes and ovarian tissue. In "Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction" Report of a meeting on "Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction" held at WHO Headquarters in Geneva, Switzerland 2002:142-151.

52. Picton H.M. Activation of Follicle Development: The Primordial Follicle. *Theriogenology* 2001; 55: 1193-1210.
53. Picton H.M. and Gosden R.G. In vitro growth of human primordial follicles from frozen-banked ovarian tissue. *Mol. Cell. Endocrinol* 2000; 166 : 27–35.
54. Qu, J., Nisolle, M. and Donnez, J. Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertil. Steril.* 2000; 74 (1): 113-121.
55. Rimon E., Cohen T, Amsterdama A., Amit A., Lessing J. and Azem F. Apoptosis in cryopreserved ovarian tissue a tool of evaluation cryopreservation utility. *Fertil. Steril.* 2003; 80 Suppl. (3): 149.
56. Rodrigues A.P.R., Amorim C.A., Costa S.H.F., Matos M.H.T., Santos R.R., Lucci C.M., Ba'ó S.N., Ohashi O.M. and Figueiredo J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology* 2004; 61:1009–1024.
57. Salle B., Demirci B., Franck M., Berthollet C, and Lornage J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertil. Steril.* 2003; 80 (1): 172-177.
58. Salle B., Lornage J., Demirci B., Vaudoyer F., Poiriel M.T., Frank M., Rudigoz R.C. and Guerin J.F. Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing, and autograph of hemi-ovary in sheep. *Fertil. Steril.* 1999; 72 (2) : 366-370.

59. Salle B., Lornage J., Frank M., Isoard L., Rudigoz R.C. and Guerin J.F.. Freezing, thawing, and autograph of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histological assessment. *Fertil. Steril.* 1998; 70 (1) : 124-128.
60. Salehnia M. and Moazzeni S.M. Autograft of vitrified mouse ovarian tissue using ethylene glycol as cryoprotectant. Abstracts of the 17th Annual meeting of the "European Society of Human Reproduction and Embryology", Lausanne, Switzerland 2001.
61. Schmidt K.L.T., Ernst E., Byskov A.G., Nyboe Andersen A. and Yding Andersen C. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum. Reprod.* 2003;18 (12).
62. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000; 53:59-72.
63. Silva R.A., Morato G .R., Silva D.M. L. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 81: 159–175.
64. Smitz J. and Cortvrindt R. Follicle culture after ovarian cryostorage. *Maturitas* 1998; 30: 171-179.
65. Sugimoto M., Maeda., Manabe. and Miyamoto H. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology* 2000; 53: 1093-1103.
66. Sztejn J.M., O'Brien M.J., Farley J.S., Mobraaten L.E. and Eppig J.J. Rescue of oocyte from antral Follicles of cryopreserved mouse ovaries:

competence to undergo maturation, embryogenesis and development to term Hum. Reprod. 2000; 15 (3): 567-571.

67. Wolvekamp M.C.J., Cleary M.L., Cox S.-L., Shaw J.M., Jenkin G., Trounson A.O. Follicular development in cryopreserved Common Wombat ovarian tissue xenografted to Nude rats. Anim. Reprod. Sci. 2001; 65 : 135–147.

68. Weissman A., Gottlieb L., Colgan T., Jurisicova A., Greenblatt M. E., and Casper F. R. Preliminary Experience with Subcutaneous Human Ovarian Cortex Transplantation in the NOD-SCID Mouse. Biol. Reprod. 1999; 60: 1462–1467.

69. Yuksel A. Cryopreservation of Oocyte and Ovarian Tissue. Institute of Laboratory Animal Research Journal 2000; 41(4) : 207-220.

11.ANEXOS

11.1 Fotos obtención y evaluación de folículos.

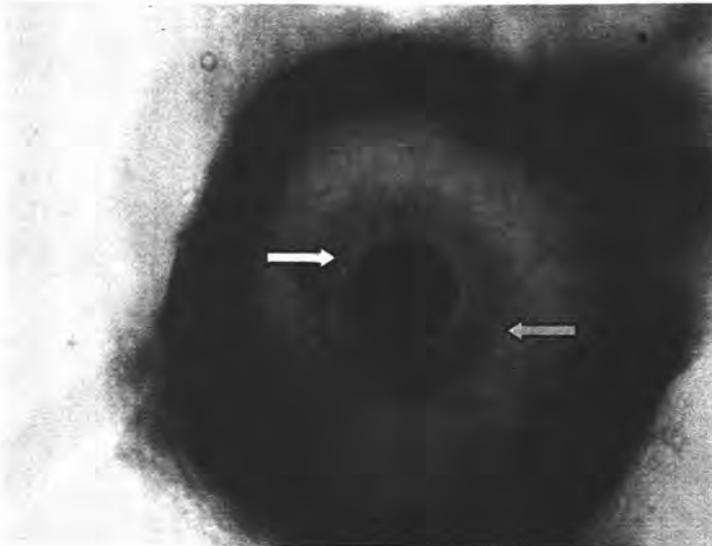


Foto 11.1.1 Folículo antral aislado de tejido ovárico de perra. Se observa dentro del folículo un ovocito totalmente formado con zona pelúcida (flecha blanca) y rodeado de células de la granulosa (flecha gris). Aumento 100X.

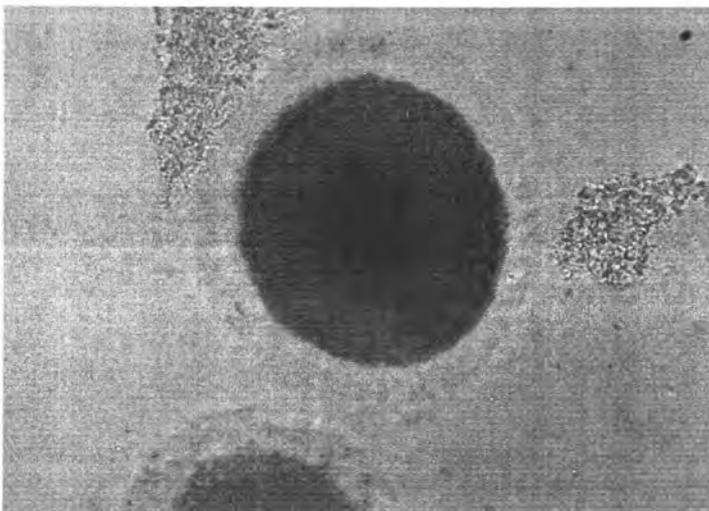


Foto 11.1.2 Ovocito de perra se observa oscuro por la presencia de lípidos intracitoplasmáticos. Aumento 400X.

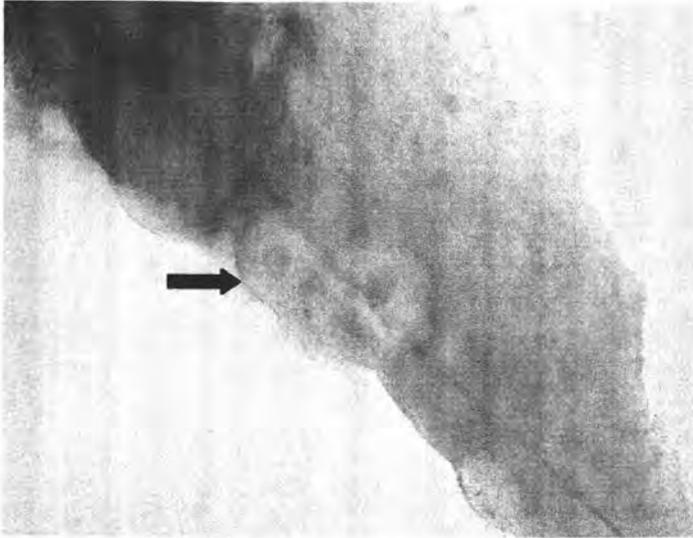


Foto 11.1.3
Folículos preantrales de perra
en un trozo de corteza ovárica.
Aumento 100X.



Foto 11.1.4
Folículos preantrales de perra
rodeados por una capa de
células de la granulosa,
además no se observa la
presencia de zona pelúcida.



Foto 11.1.5 Folículo preantral
de ratón. Hartshorne G.M.
1997. Aumento 400X.



Foto 11.1.6
Folículos preantrales
evaluados postdescongelado
con una solución de azul tripán
al 0.4%. No teñidos (vivos).
Aumento 400X.

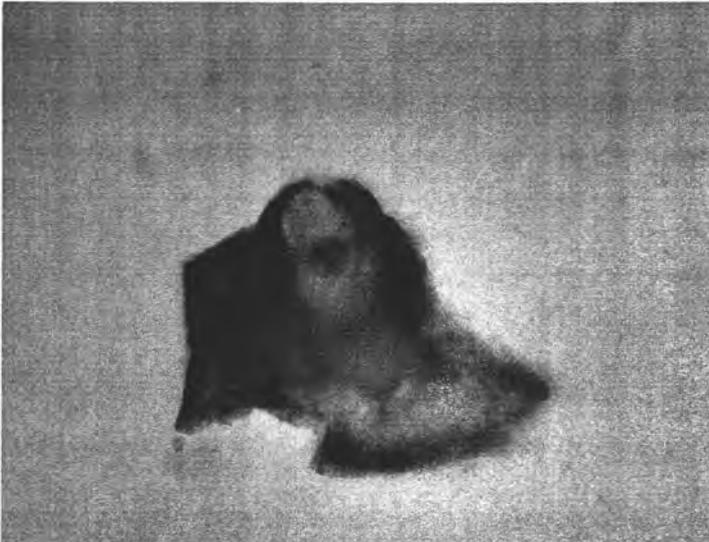


Foto 11.1.7 Folículo preantral
evaluado postdescongelado
con una solución de azul tripán
al 0.4%. Teñido (muerto).
Aumento 400X.

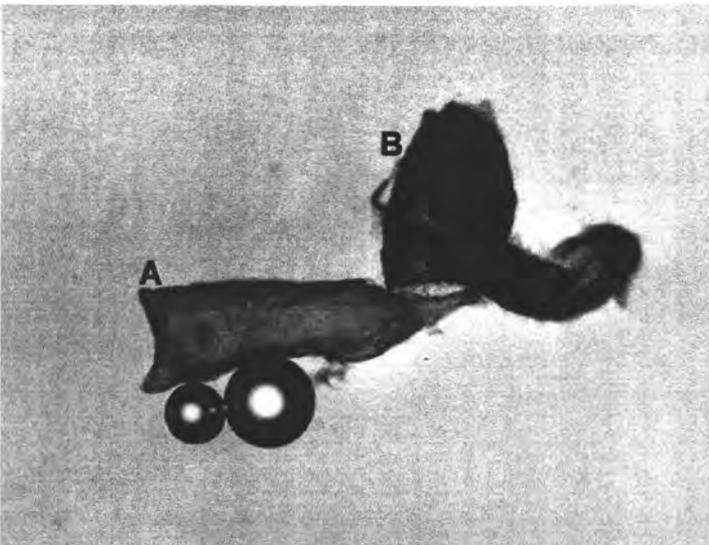


Foto 11.1.8
Folículos preantrales vivo (A)
y muerto (B) evaluados
postdescongelado con una
solución de azul tripán al 0.4
%. Aumento 400X.

11.2 Fotos técnica de transplante.

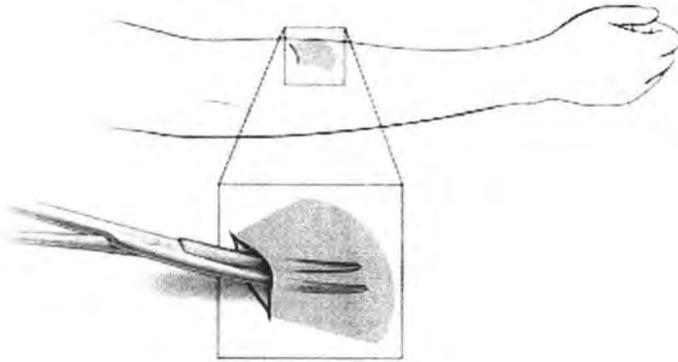


Figura 11.2.1 Modificado de Oktay et. al. Fertility and Sterility 2003.

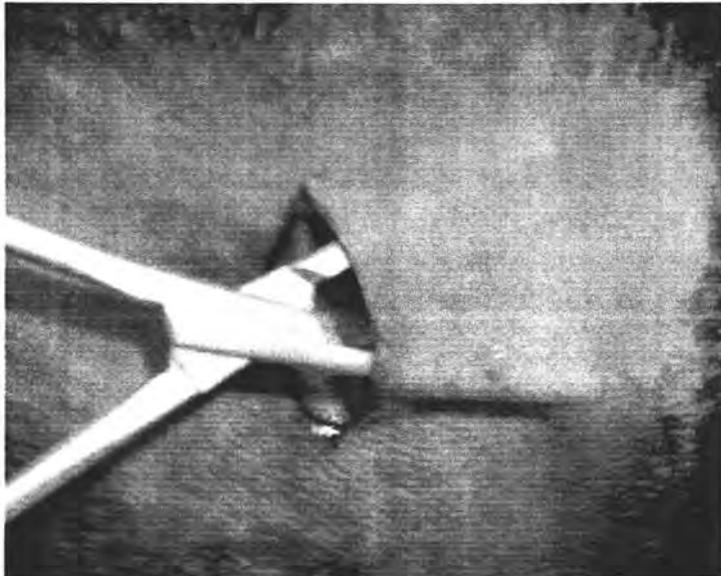


Foto 11.2.1 Usando unas tijeras se hizo una bolsa entre la fascia muscular y el tejido subcutáneo.

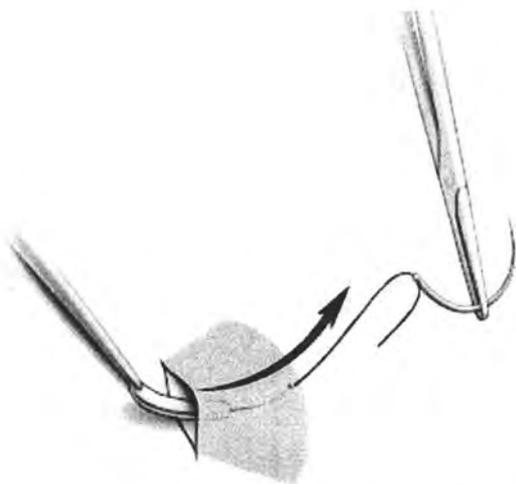


Figura 11.2.2 Modificado de Oktay et. al. Fertility and Sterility 2003.



Foto 11.2.2 La aguja se pasa a través de la piel, y la pieza cortical es metida en la bolsa subcutánea jalando la sutura.



Foto 11.2.3 El tejido transplantado es siempre insertado con el lado de la corteza hacia arriba.



Figura 11.2.3 Modificado de Oktay et. al. Fertility and Sterility 2003.

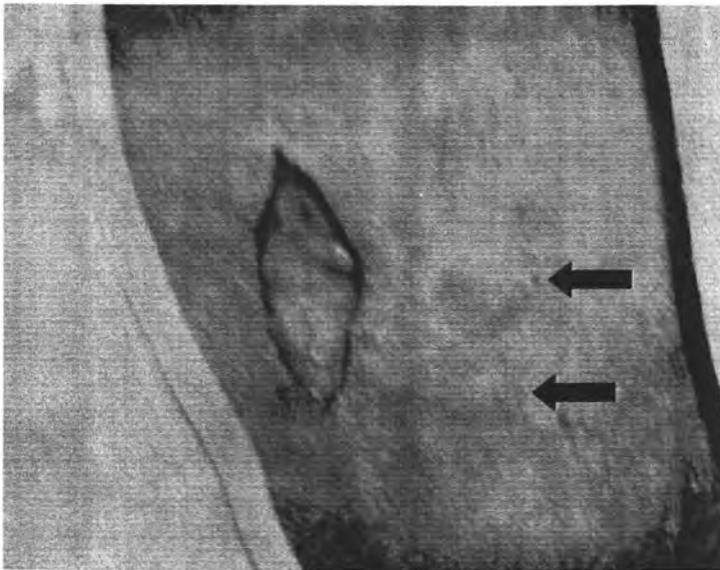


Foto 11.2.4 Corteza ovárica dentro de la bolsa subcutánea.

11.3 Fotos recuperación de tejido ovárico.

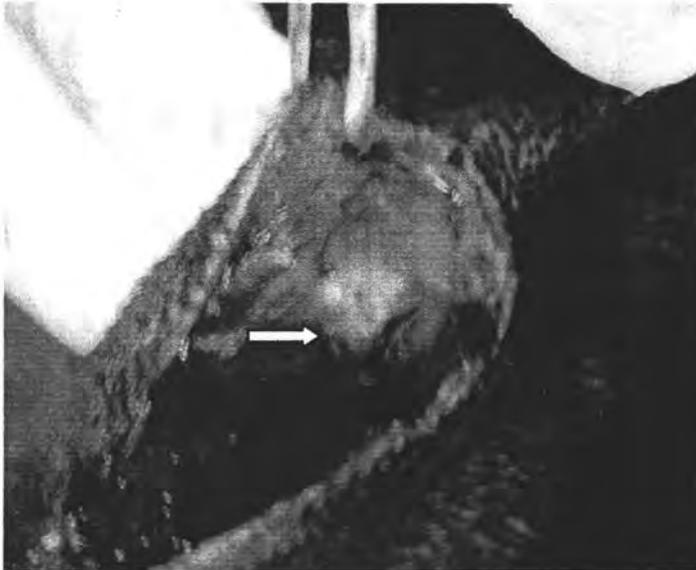


Foto 11.3.1 Corteza ovárica adosada al tejido subcutáneo en la zona de la escápula.

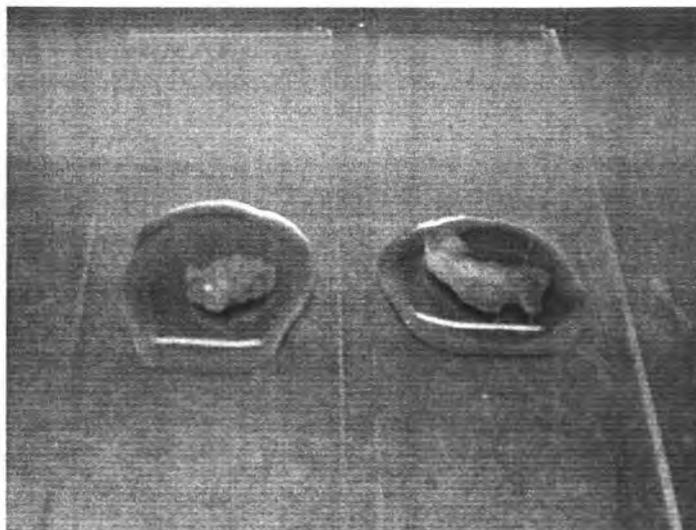


Foto 11.3.2 Tejido ovárico recuperado tres meses después de haberlo reimplantado subcutáneamente en la escápula.

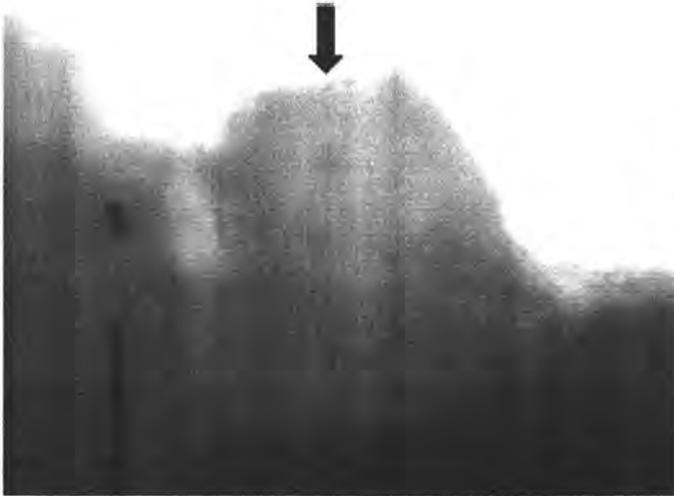


Foto 11.3.3 Folículo preantral avanzado observado bajo el microscopio estereoscópico. Tejido recuperado de "DEN" tres meses después de haberlo reimplantado aumento 100X.



Foto 11.3.4 Corte histológico del tejido obtenido de "DEN", en donde se observa un folículo preantral avanzado. Magnificación original 100X.

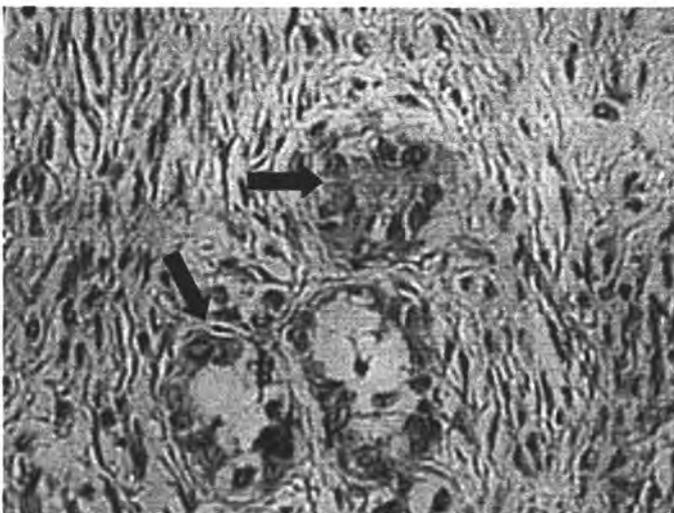


Foto 11.3.5 Corte histológico del tejido obtenido de "LIG", en donde se observan folículos atresicos. Magnificación original 400X.

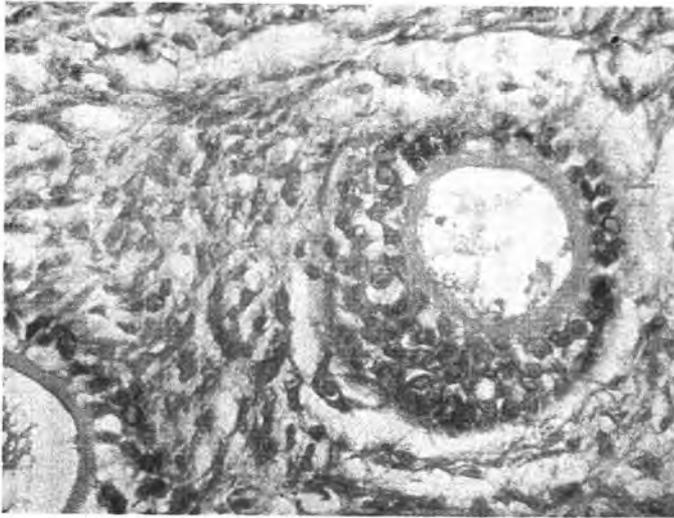
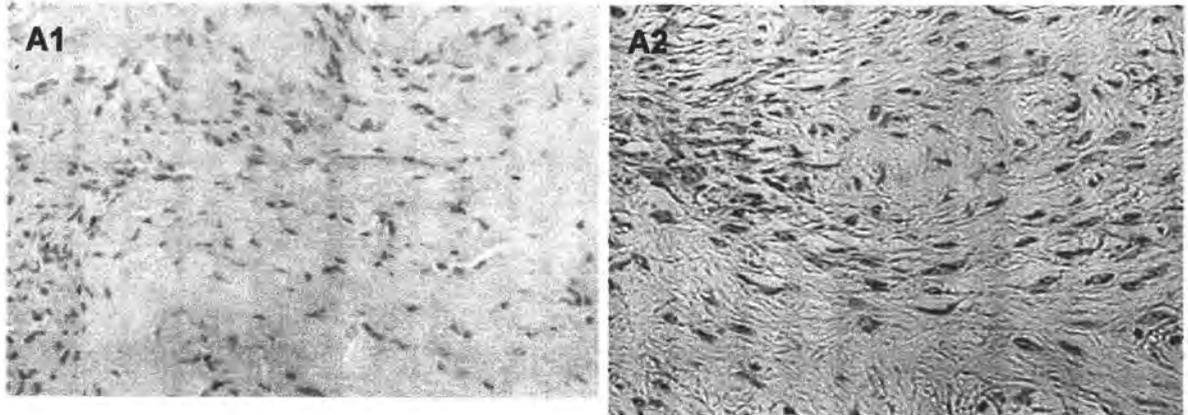
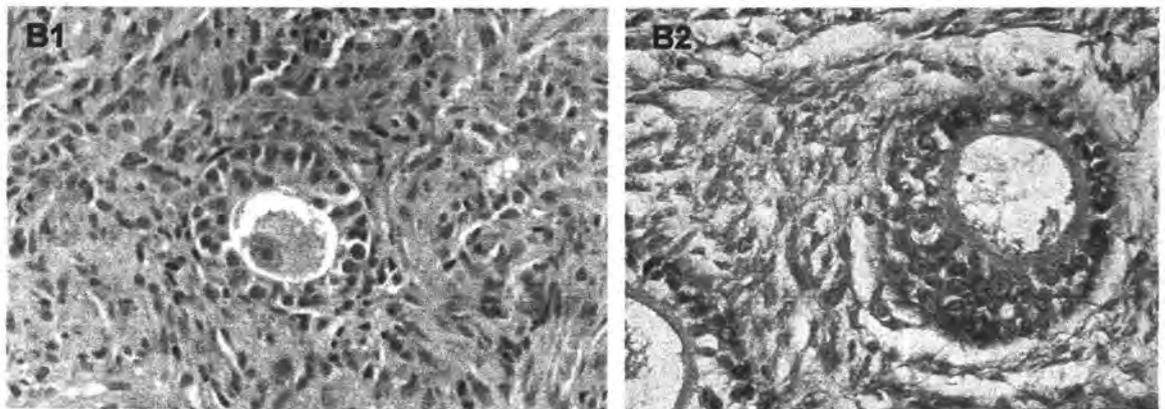


Foto 11.3.6 Corte histológico del tejido obtenido de NEG, en donde se observa un folículo secundario. Magnificación original 400X.

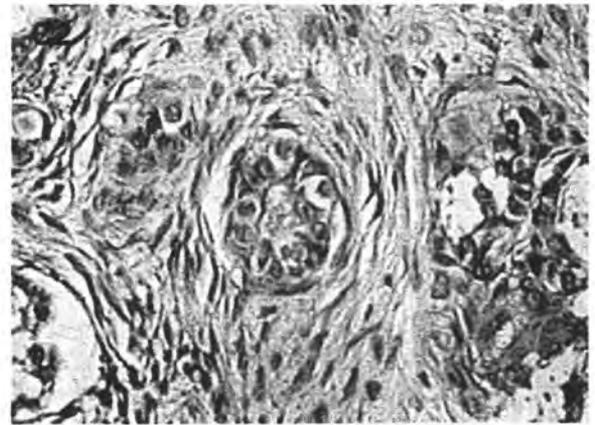
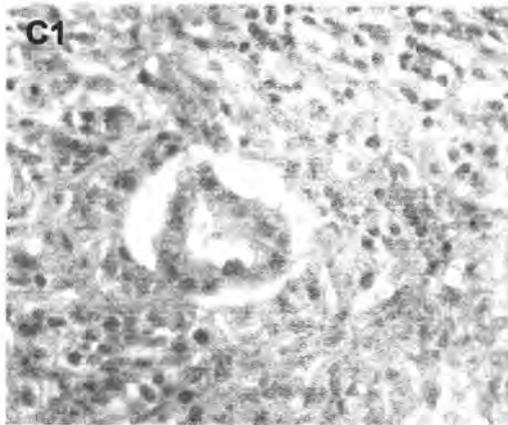
11.4. Comparación fotográfica de cortes histológicos obtenidos de tejido ovárico en el Wombat (canguro) (Wolvekamp y cols., 2001) y la perra doméstica.



Cortes histológicos de tejido ovárico. A1, tejido de Wombat recobrado 10 semanas después haberlo xenotransplantado sobre la capsula renal de rata desnuda. A2, tejido de perra domestica recuperado 3 meses (12 semanas) después de haberlo autoimplantado subcutáneamente a nivel de escápula, ambos se observan en apariencia fibroso y carente de folículos.



Cortes histológicos de tejido ovárico. B1, tejido de Wombat recobrado 10 semanas después haberlo xenotransplantado. B2, tejido de perra domestica recuperado 3 meses (12 semanas) después de haberlo autoimplantado subcutáneamente, en ambos se observa la presencia de folículos preantrales con dos o tres capas de células de la granulosa.



Cortes histológicos de tejido ovárico. C1, tejido de Wombat recobrado 10 semanas después haberlo xenotransplantado. C2, tejido de perra domestica recuperado 3 meses (12 semanas) después de haberlo autoimplantado subcutáneamente, en ambas secciones se observa la presencia de folículos atresicos los cuales han perdido su integridad estructural.