

Vitrificación de tejido ovárico porcino: efecto de diferentes agentes crioprotectores en la preservación de la morfología de folículos preantrales

Vitrification of porcine ovarian tissue: effect of different crioprective agents in the preservation of preantral follicles morfology

Gabriel, P.¹; Torres P.¹; Boviez J.²; Cisale H.¹; Lombardo D.M.²; Fischman ML.¹

¹Cátedra de Física Biológica, ²Cátedra de Histología, ^{1,2}Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280. (C1427CWO). CABA. Argentina*.

RESUMEN

La vitrificación de tejido ovárico permite conservar gran cantidad de ovocitos contenidos en folículos preantrales (FPA). El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de distintas combinaciones de crioprotectores en la preservación de la estructura histológica de FPA porcinos durante la exposición (toxicidad) y en el proceso de vitrificación. Se analizó la respuesta frente a etilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), y etilenglicol + DMSO, en presencia de sacarosa (0,25M); y la respuesta a etilenglicol asociado a concentraciones crecientes de sacarosa (0M; 0,25M; 0,75M y 1,0M). Los FPA primordiales tratados con etilenglicol presentaron menor cantidad de alteraciones morfológicas que los expuestos a DMSO y a la combinación de etilenglicol + DMSO (Control: 87%; etilenglicol: 52%; DMSO: 17% y etilenglicol + DMSO: 26%; Friedman, $p < 0,05$). En los FPA primarios el etilenglicol resultó menos tóxico (Control: 70%; etilenglicol: 34%), mientras que la respuesta a la vitrificación del grupo etilenglicol + DMSO fue superior (20%). La vitrificación en presencia de concentraciones crecientes de sacarosa disminuyó significativamente el porcentaje de folículos primordiales normales (Control: 64%; 0M: 48%; 0,25M: 42%; 0,75M: 12%; 1M: 9%). Para todos los tratamientos, los folículos primarios presentaron más daños. En conclusión, el medio de elección para la vitrificación resultó ser TCM 199-Hepes con 30% etilenglicol y 0 o 0,25M de sacarosa.

Palabras clave: (Ovario), (Vitrificación), (Porcino), (Crioprotectores), (Sacarosa).

Correspondencia *e-mail*: Laura Fischman fischman@fvvet.uba.ar

Recibido: 22-08-2012

Aceptado: 01-10-2012

* Premio Estímulo a la Investigación Científica 2011 en la Categoría Estudiante de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

SUMMARY

Ovarian tissue vitrification allows storage of large numbers of oocytes contained in preantral follicles (PAF). The aim of the present study was to analyze the effect of different combinations of crioprotective agents in the preservation of porcine PAF histologic structure during the exposition (toxicity) and vitrification processes. The responses of oocytes to ethylene glycol, dimethyl sulfoxide (DMSO) and a combination of both, with the addition of sucrose (0,25 M), and to ethylene glycol associated to growing concentrations of sucrose (0M; 0,25M; 0,75M and 1,0M) were analyzed. Primordial PAF treated with ethylene glycol presented fewer morphological abnormalities than the ones exposed to DMSO and ethylene glycol + DMSO combined (Control: 87%; etilenglicol: 52%; DMSO: 17% y etilenglicol + DMSO: 26%; Friedman $p < 0,05$). In primary PAF, etilenglicol was the least toxic (Control: 70%; etilenglicol: 34%), while vitrification response of the ethylene glycol + DMSO group was superior (20%). Vitrification with growing concentration of sucrose led to reduction of normal primordial follicles percentage (Control: 64%; 0M: 48%; 0,25M: 42%; 0,75M: 12%; 1M: 9%). In all treatments, primary follicles were more damaged. In conclusion, the culture media of choice for vitrification was TCM 199-Hepes with 30% etilenglicol and 0 or 0,25M sucrose.

Key words: (Ovary), (Vitrification), (Porcine), (Cryoprotectants), (Sucrose).

INTRODUCCIÓN

Los bancos de germoplasma permiten almacenar gametas y embriones con vistas a su utilización futura en la clínica reproductiva; además, constituyen una herramienta fundamental para salvaguardar material genético de especies en peligro de extinción o de individuos con genotipo destacable para su especie¹¹.

En animales domésticos la obtención de embriones implica costos de producción sumamente elevados¹⁷. Los tratamientos de estimulación hormonal tienen respuesta variable en cuanto a la cantidad de embriones colectados, aun en una misma hembra⁹. Por otra parte, la obtención de embriones está supeditada a la edad del animal²⁰.

La criopreservación de ovocitos en diferentes estadios de maduración meiótica tiene resultados aleatorios debido a múltiples factores. El tamaño de los ovocitos (80-120 μm según la especie) y las características de su membrana citoplasmática hacen que los procesos de deshidratación y reemplazo del agua intracelular por agentes crioprotectores (ACP) sean difíciles⁸, pudiéndose producir la liberación prematura de los gránulos corticales

y, en consecuencia, el endurecimiento de la zona pelúcida^{26, 6, 15}. Además, el huso meiótico es altamente sensible a las modificaciones de temperatura, se despolimeriza durante el enfriamiento y esto ocasiona la migración anormal de cromosomas y, en consecuencia, aneuploidía^{9, 18, 3}.

La criopreservación de tejido ovárico constituye una alternativa que permite conservar gran cantidad de ovocitos contenidos en FPA. A diferencia de los ovocitos que ya han completado su crecimiento, las células germinales contenidas en los FPA son menos vulnerables al daño criogénico. Estos ovocitos son más pequeños, están rodeados por menor cantidad de células de la granulosa, presentan baja tasa metabólica, carecen de zona pelúcida y de gránulos corticales, y tienen escasa cantidad de lípidos intracitoplasmáticos^{10, 24}. En este estadio, los ovocitos de los folículos preantrales se encuentran arrestados en la profase de la primera división meiótica, lo que disminuye los riesgos de alteraciones genéticas y favorece la reparación posterior de organelas y otras estructuras celulares que pudieran dañarse durante la criopreservación. Otra ventaja es que la obtención de las muestras a conservar

es independiente de la edad del animal y del momento del ciclo estral, pudiendo llevarse a cabo inclusive en hembras muertas^{18, 24}.

En la especie porcina en particular existen pocos trabajos referidos a la criopreservación de folículos preantrales o de tejido ovárico. Algunos autores reportan buenos resultados utilizando curvas de enfriamiento controlado en presencia de distintos ACP permeables -dimetilsulfóxido, etilenglicol, propilenglicol y glicerol^{7, 2}. Otros sostienen que la vitrificación es más eficiente¹⁶. Sea enfriamiento gradual o vitrificación, los ACP mencionados cumplen la función de reemplazar el agua intracitoplasmática, disminuyendo la formación de cristales de hielo en el interior de la célula. La mayoría de los medios de criopreservación incluyen el agregado de ACP no permeables y de suero fetal. Fabbri *et al.*⁵ demostraron que estas sustancias preservan la integridad estructural y funcional de la membrana celular. La sacarosa (ACP no permeable), por ejemplo, modifica el gradiente osmótico promoviendo la deshidratación celular e inhibiendo la formación de cristales intracelulares²¹. Algunos estudios han demostrado que también estabiliza los fosfolípidos presentes en la membrana celular⁴ e incrementa la supervivencia celular luego del descongelado²⁷.

En nuestro laboratorio hemos realizado ensayos de congelamiento gradual de láminas de tejido ovárico porcino en presencia de distintos agentes crioprotectores con resultados poco satisfactorios (datos no publicados), lo que nos llevó a plantear la vitrificación como alternativa.

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de distintas combinaciones de agentes crioprotectores en la preservación de la estructura histológica de folículos preantrales porcinos durante el proceso de vitrificación. Para ello se analizó la respuesta frente a dos agentes crioprotectores permeables, etilenglicol y dimetilsulfóxido (DMSO), o la combinación de ambos, en presencia de sacarosa (0,25M) como agente crioprotector extracelular; y la respuesta de un mismo agente crioprotector permeable asociado a concentraciones crecientes de sacarosa (0M; 0,25M; 0,75M y 1,0M).

METODOLOGÍA

Reactivos:

En todos los casos se utilizó medio de cultivo M199 (sales de Earle con L-Glutamina 0,69 mM; EMEVE Medios®, Industria Argentina) y suero fetal bovino (SFB; Natocor®, Industria Argentina). Los demás reactivos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

Obtención de tejido ovárico:

Se utilizaron ovarios de faena. Los mismos fueron colectados en un frigorífico cercano, transportados al laboratorio a 32-35°C, lavados con solución fisiológica estéril, y procesados a temperatura ambiente (20°C) dentro de las cinco horas posteriores a la faena. Se tomaron muestras de láminas de corteza ovárica de 5 x 2 x 1 mm utilizando cuchillas de micrótopo.

Experimento 1: Determinación de la respuesta folicular a distintos agentes crioprotectores permeables

Para determinar el agente crioprotector permeable más adecuado para nuestro sistema de trabajo, se obtuvieron 14 muestras de cada ovario (n = 10). Dos de estas muestras fueron utilizadas como control, las restantes, para las pruebas de toxicidad y vitrificación. El control se fijó directamente en solución de Bouin durante 24 h y luego se llevó a formol al 5% hasta su procesamiento histológico. Tanto para los ensayos de toxicidad como para los de vitrificación, las muestras fueron expuestas primero a una solución de equilibrio durante cinco minutos a temperatura ambiente. La solución de equilibrio estuvo compuesta por solución base (SB: TCM-199, HEPES 25Mm y antibiótico), 15% etilenglicol o 15% DMSO o la combinación de ambos (7.5% etilenglicol + 7.5% DMSO), 20% SFB y sacarosa (0,25M). Luego se colocaron en la solución de vitrificación (SB; 30% etilenglicol o 30% DMSO o 15% etilenglicol + 15% DMSO; 20% SFB y sacarosa -0,25M-) durante un minuto. Las seis muestras

para toxicidad fueron lavadas y fijadas en forma similar a los controles. Las muestras para vitrificación, antes de ser fijadas, fueron colocadas en criotubos con un volumen total de 200 µl de solución de vitrificación y llevadas a nitrógeno líquido durante una semana. Transcurrido este tiempo, fueron descongeladas a temperatura ambiente durante cinco minutos y lavadas en SB con 20% SFB y sacarosa (0,25M). Finalmente, fueron fijadas en solución de Bouin. En todos los casos, las muestras luego de ser fijadas fueron deshidratadas, clarificadas, incluidas en parafina y cortadas con micrótopo. Para su evaluación histológica se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y los cortes fueron observados con microscopía de campo claro (400x).

Experimento 2: Determinación de la respuesta de FPA a la vitrificación frente a concentraciones crecientes de sacarosa

En función a los resultados obtenidos en el Experimento 1, se utilizó etilenglicol como agente crioprotector permeable. Para analizar la respuesta frente a concentraciones crecientes de sacarosa como agente crioprotector no permeable en la solución de vitrificación, se obtuvieron 10 muestras de cada ovario (n = 10). Dos de estas muestras fueron utilizadas como control, se fijaron directamente en solución de Bouin durante 24 horas y luego se colocaron en formol al 5% hasta su procesamiento histológico. El resto de las muestras se utilizaron en el ensayo de vitrificación. Para esto fueron enfrentadas a una solución de equilibrio (SB; 15% etilenglicol; 20% SFB y 0 - 0,25M - 0,75M o 1M sacarosa) durante cinco minutos, y luego colocadas un minuto en la solución de vitrificación (SB; 30% etilenglicol; 20% SFB; 0M - 0,25M - 0,75M o 1M sacarosa). Los criotubos conteniendo el tejido inmerso en 200 µl de solución de vitrificación fueron llevados a nitrógeno líquido y almacenados durante una semana. Las muestras fueron descongeladas y enfrentadas durante cinco minutos a una solución de lavado (SB; 20% SFB y 0M - 0,25M - 0,75M o 1M

sacarosa). Se fijaron de la misma manera que los controles. Para su evaluación histológica se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y los cortes fueron observados con microscopía de campo claro (400x).

Criterios de clasificación y evaluación folicular:

En ambos experimentos, los folículos se clasificaron en dos categorías según la morfología de las células de la granulosa: folículos primordiales, aquellos que presentaron ovocitos rodeados por una monocapa de células de la granulosa planas, y folículos primarios, los que presentaron ovocitos rodeados por una monocapa de células de la granulosa cuboidales²⁵.

En cuanto al daño, tanto los folículos primordiales como los primarios fueron clasificados en normales o anormales siguiendo el criterio descrito por Rodrigues *et al.*¹⁹. Se consideraron anormales aquellos folículos que presentaron ovocitos degenerados (OD) con diverso grado de picnosis nuclear con membrana nuclear continua (PN), membrana nuclear discontinua (MND), picnosis nuclear y membrana nuclear discontinua (PN/MND) y/o citoplasma vacuolado/eosinofílico. Asimismo se consideraron anormales los folículos con células de la granulosa degeneradas (CGD).

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de ambos experimentos se realizó a través del test no paramétrico de la varianza por rangos de Friedman, ya que se trató de un diseño en bloques completamente aleatorizados. Se utilizó un nivel de significación del 5%.

Para determinar si la respuesta al tratamiento de vitrificación con etilenglicol y 0,25M de sacarosa en presencia de SFB fue equivalente en ambos experimentos, se aplicó el test de la mediana para muestras independientes. Se utilizó un nivel de significación del 5%.

La aparición de lesiones a distinto nivel folicular, tanto en el ovocito como en las

células de la granulosa, fue analizada mediante estadística descriptiva utilizando tablas y gráficos de frecuencia.

RESULTADOS

Experimento 1: Determinación de la respuesta folicular a distintos agentes crioprotectores permeables

En la evaluación morfológica de los folículos primordiales y primarios pertenecientes a los controles, se observó que la mayoría de ellos (87% de los primordiales y 70% de los primarios) presentaron núcleos ovalados, con escasa o nula picnosis, bien delimitados por una membrana nuclear intacta. El grado de vacuolización y eosinofilia del citoplasma de estos folículos fue leve o inexistente. Las células de la granulosa conservaron la disposición espacial normal y sus núcleos presentaron leve o nula cromatina picnótica. Cuando el tejido ovárico fue sometido a las pruebas de toxicidad y vitrificación, se observó un incremento en el porcentaje de folículos dañados tanto primordiales como primarios. La utilización de etilenglicol permitió preservar un mayor número de FPA primordiales sin alteraciones morfológicas, mientras que en las muestras expuestas a DMSO y a la combinación de etilenglicol + DMSO, se redujo significativamente el porcentaje de FPA primordiales normales (Control: 87%; etilenglicol: 52%; DMSO: 17% y etilenglicol + DMSO: 26%; $p < 0,05$) (Gráfico 1). Con respecto a los FPA primarios, si bien el tratamiento con etilenglicol resultó menos tóxico (Control: 70%; etilenglicol: 34%), el grupo etilenglicol + DMSO respondió mejor al proceso de vitrificación (20%). Las diferencias encontradas entre las pruebas de toxicidad y vitrificación no fueron significativas (Gráfico 2).

En lo que respecta a la localización del daño folicular, tanto en folículos primordiales como primarios, la mayor cantidad de lesiones se observó a nivel del ovocito (OD) y del ovocito junto con células de la granulosa (OD/CGD), los daños a nivel de las células de la granulosa exclusivamente fueron los de menor incidencia

(CGD). Los resultados, expresados en porcentaje respecto del total de folículos observados (398 folículos primordiales y 332 folículos primarios), se detallan en la Tabla 1.

En los ovocitos de FPA primordiales sometidos a vitrificación, el mayor daño se produjo a nivel nuclear y del núcleo y citoplasma combinados, siendo el daño citoplasmático aislado el menos frecuente. En cuanto al daño a nivel nuclear, las anomalías más frecuentemente observadas fueron picnosis nuclear (PN: entre 15 y 27% según el tratamiento realizado) y núcleo picnótico con ruptura de membrana nuclear (PN/MND: 16 al 21%). En los ovocitos de folículos primarios vitrificados, también se observó mayor porcentaje de daños en núcleo y en núcleo y citoplasma combinados (Gráfico 3), siendo la lesión más frecuente la picnosis nuclear (PN: 33 al 42%, según el ACP empleado).

El porcentaje de lesiones citoplasmáticas encontradas con los distintos tratamientos se detallan en la Tabla 1. En los folículos primordiales, el empleo de DMSO aumentó el porcentaje de citoplasmas dañados. En los FPA primarios todos los tratamientos mostraron porcentajes elevados de daño citoplasmático.

En la Figura 1 se muestran FPA primordiales y primarios normales de muestras control y en la Figura 2, diferentes alteraciones morfológicas correspondientes a muestras sometidas a los distintos tratamientos.

Experimento 2: Determinación de la respuesta de FPA a la vitrificación en presencia de concentraciones crecientes de sacarosa

En base a los resultados obtenidos en el Experimento 1 se utilizó etilenglicol como agente crioprotector permeable, con 20% de SFB y concentraciones crecientes de sacarosa.

La respuesta al tratamiento de vitrificación con etilenglicol y sacarosa (0,25M) en presencia de SFB no presentó diferencias significativas entre ambos experimentos ($p > 0,05$).

El porcentaje promedio de folículos primordiales y primarios normales en los controles

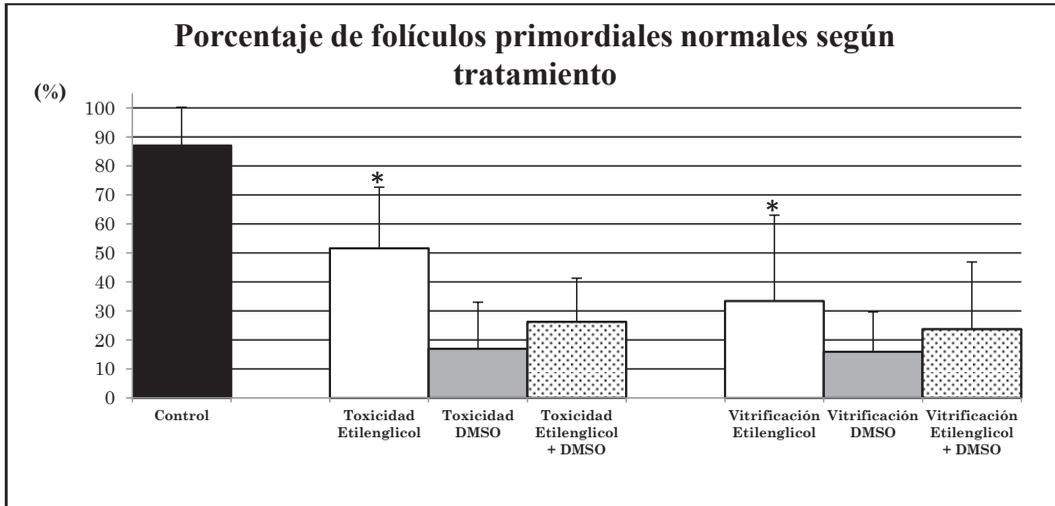


Gráfico 1. Porcentaje promedio de folículos primordiales normales en función del tratamiento utilizado. El tratamiento con Etilenglicol fue significativamente superior tanto en las pruebas de toxicidad como en las de vitricificación (*).

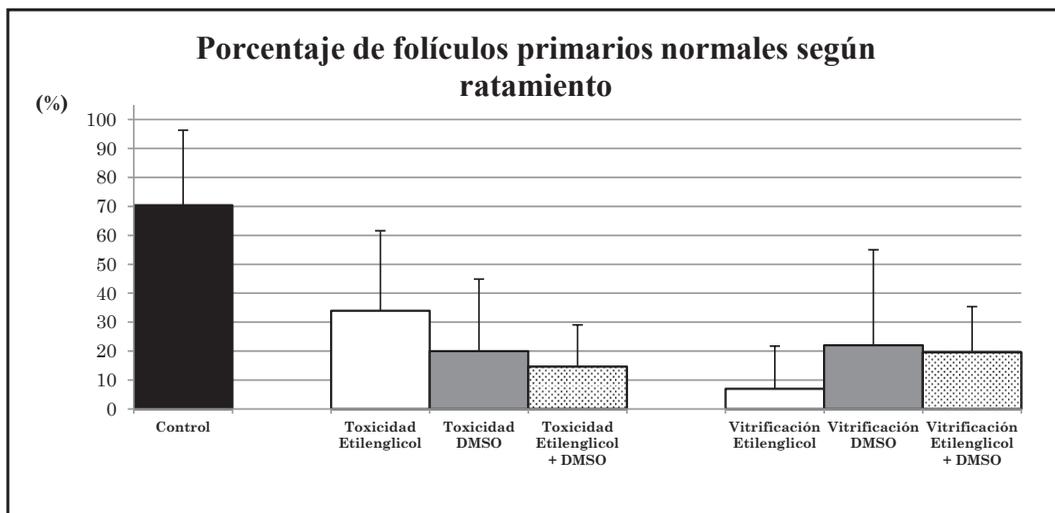


Gráfico 2. Porcentaje promedio de folículos primarios normales en función del tratamiento utilizado. No se observaron diferencias significativas entre las pruebas de toxicidad ni entre las de vitricificación.

fue de 64% y 55% respectivamente. La vitricificación en presencia de concentraciones crecientes de sacarosa disminuyó significativamente el porcentaje de folículos normales. En ausencia de sacarosa o a bajas concentraciones de la misma (0 y 0,25M), el porcentaje de folículos normales post vitricificación fue similar, mientras que a concentraciones mayores (0,75 y 1,0M) se observó mayor efecto deletéreo. Al igual que en el Experimento 1, los folículos primarios se

mostraron más sensibles a la criopreservación que los primordiales. Los resultados se muestran en los Gráficos 4 y 5.

En lo que respecta a la localización del daño folicular, el patrón de distribución del daño fue similar al del Experimento 1. Se observaron 393 folículos primordiales y 377 folículos primarios. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. La solución con sacarosa 1,0M produjo el mayor porcentaje de alteraciones en el grupo OD y CGD.

VITRIFICACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO PORCINO

Tabla 1. Porcentaje de folículos que presentaron ovocito degenerado (OD), células de la granulosa degeneradas (CGD) o ambas lesiones (OD y CGD). Porcentaje de ovocitos con citoplasma dañado (vacuolización y/o eosinofilia). Valores correspondientes al total de folículos primordiales y primarios evaluados (398 y 332, respectivamente) sometidos a los diferentes tratamientos de vitrificación.

		Localización de Lesiones en Folículos (%)			Daño Citoplasmático en Ovocitos (%)
		OD	CGD	OD y CGD	
Primordiales	Control	13	4	18	14
	Vitrificación Etilenglicol	33	12	11	25
	Vitrificación DMSO	34	7	37	45
	Vitrificación Etilenglicol + DMSO	37	2	35	21
Primarios	Control	15	7	22	20
	Vitrificación Etilenglicol	29	13	37	55
	Vitrificación DMSO	15	7	56	52
	Vitrificación Etilenglicol + DMSO	18	3	56	45

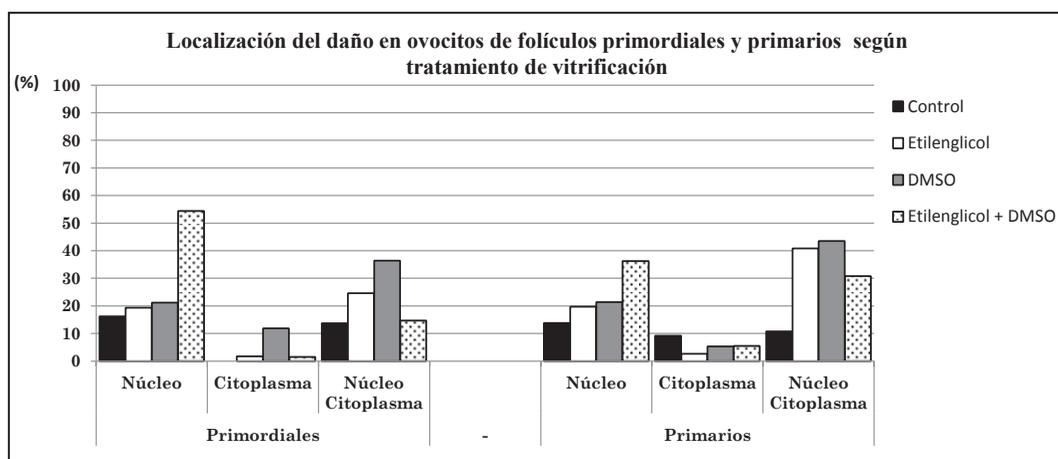


Gráfico 3. Muestra la frecuencia de localización del daño en ovocitos de folículos primordiales y primarios sometidos a los diferentes tratamientos de vitrificación. Valores expresados en porcentaje

En los ovocitos de FPA primordiales, el mayor daño se produjo a nivel del núcleo, y del núcleo y citoplasma combinados. Se observó que el porcentaje de daño fue menor en los grupos 0 y 0,25M de sacarosa con respecto a los vitrificados en presencia de 0,75 y 1,0M de sacarosa. La distribución de anomalías en los folículos primarios fue similar. En este caso, al modificar la concentración de sacarosa, las mayores diferencias se observaron en el daño del núcleo (Gráfico 6).

La anomalía nuclear más frecuentemente observada fue la combinación PN/MND, que en el caso de los ovocitos de los folículos primarios alcanzó el 70% al vitrificar en presencia de sacarosa 1M.

En lo que respecta al daño citoplasmático de los ovocitos de folículos primordiales, se observó que concentraciones bajas de sacarosa resultaron menos nocivas que las mayores concentraciones, mientras que en los folículos primarios no se observaron diferencias entre el control y los

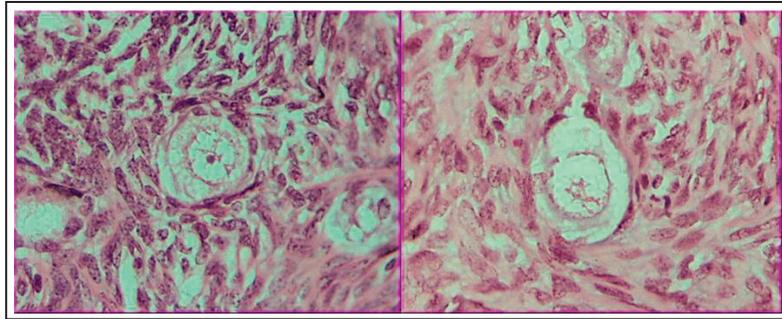


Figura 1. Izquierda: folículo primario normal; derecha: folículo primordial normal. Técnica de Hematoxilina – Eosina, x400

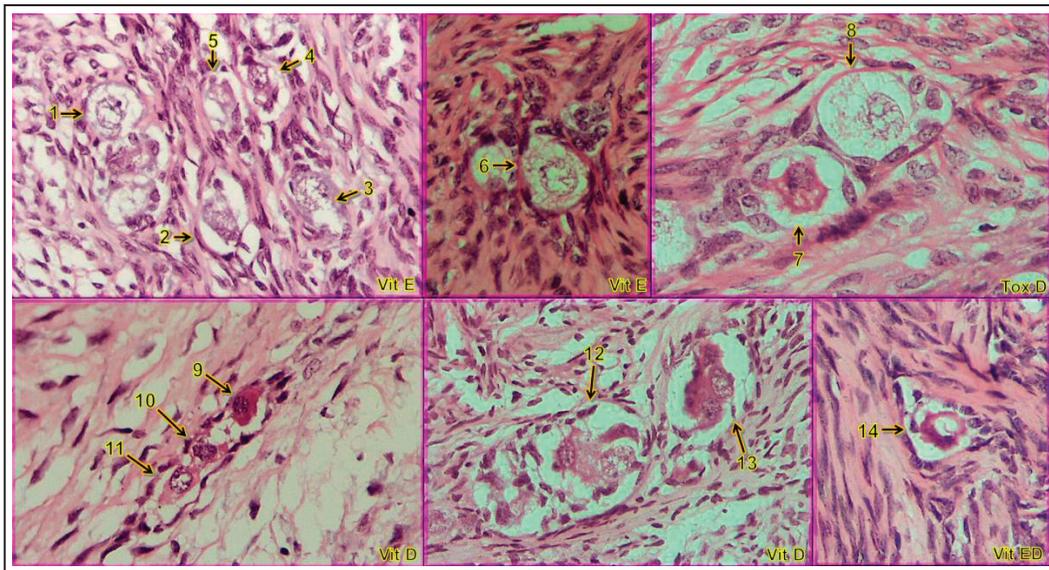


Figura 2. 1: folículo primordial normal. 2: folículo primordial con retracción citoplasmática. 3 y 4: folículos primordiales con epitelio desorganizado, citoplasma vacuolado y núcleo picnótico. 5: folículo primario con epitelio desorganizado y citoplasma vacuolado. 6: folículo primordial con núcleo picnótico y membrana nuclear lesionada. 7: folículo primario con citoplasma eosinofílico y vacuolado, núcleo picnótico y membrana nuclear lesionada. 8: folículo primario con citoplasma vacuolado, núcleo picnótico, y membrana nuclear lesionada. 9 10 y 11: folículos primarios con núcleo picnótico, citoplasma eosinofílico y vacuolado. 12 y 13: folículos primordiales con epitelio desorganizado, retracción y eosinofilia citoplasmática y núcleo picnótico. 14: folículo primario con retracción y eosinofilia citoplasmática, células de la granulosa picnóticas. Técnica de Hematoxilina – Eosina, x400

distintos tratamientos (Tabla 2).

En la Figura 3 se observan FPA primordiales y primarios con diferentes alteraciones morfológicas correspondientes a muestras vitrificadas con concentraciones crecientes de sacarosa.

DISCUSIÓN

En la primera parte del trabajo se evaluó el efecto tóxico de diferentes ACP permeables (etilenglicol, DMSO o la combinación de

ambos), así como las alteraciones producidas por el proceso de vitrificación sobre la morfología de folículos preantrales porcinos. La selección de ACP empleados y las concentraciones de los mismos fueron fijadas en base a los antecedentes bibliográficos^{17, 1, 22}.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que la mera exposición a las soluciones de vitrificación (ensayos de toxicidad) produce alteraciones morfológicas en los folículos preantrales primordiales y primarios,

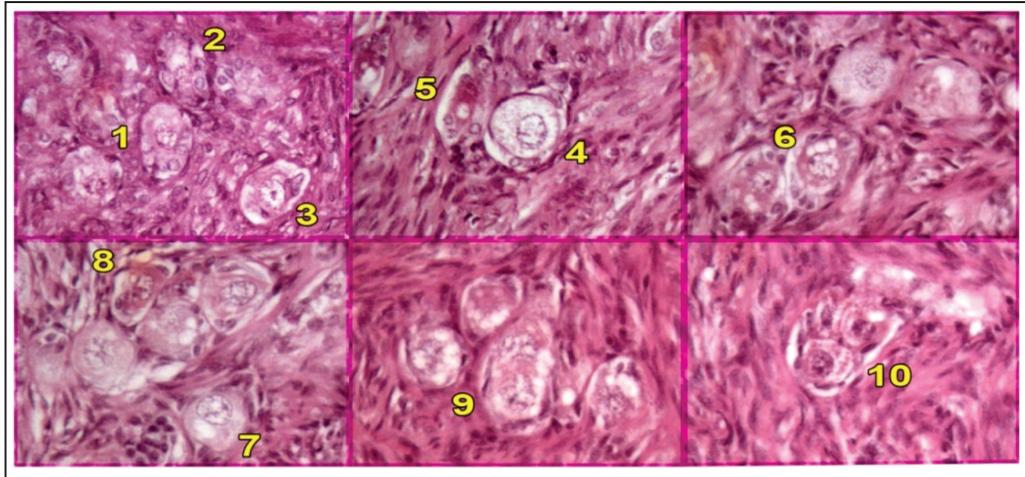


Figura 3. 1: Folículo primario con membrana nuclear lesionada. 1,2,3: Folículos primarios y primordial con células de la granulosa desorganizadas. 4: Folículo primordial normal. 5: Folículo primario con retracción y aumento de la eosinofilia citoplasmática. Células de la granulosa desorganizadas. 6: Folículos primarios con citoplasma vacuolado. 7: Folículo primordial normal. 8: Folículo primordial con núcleo picnótico, aumento de la eosinofilia citoplasmática y epitelio desorganizado. 9: Folículos primarios con membranas nucleares discontinuas y citoplasmas vacuolados. 10: Folículos primordiales con núcleos picnóticos y células de la granulosa picnóticas. Técnica de Hematoxilina – Eosina, x400

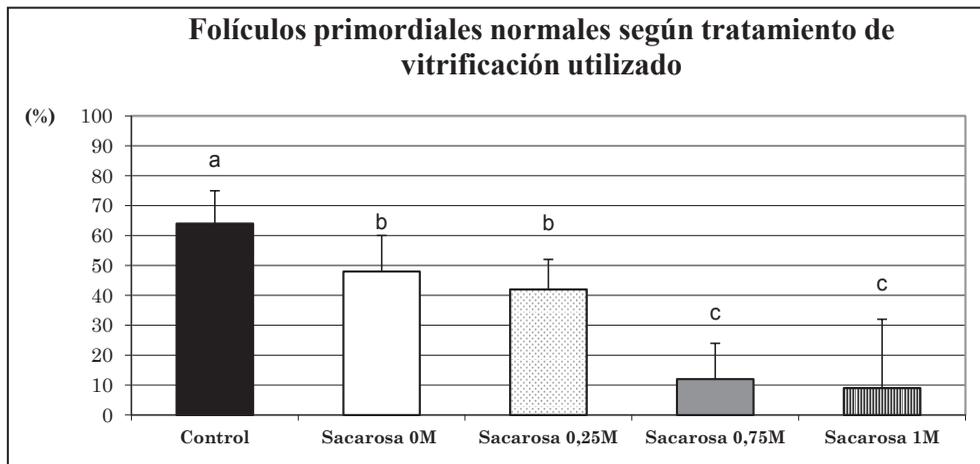


Gráfico 4. Porcentaje promedio de folículos primordiales normales luego de ser sometidos a vitrificación utilizando 30% Etilenglicol y diferentes concentraciones de sacarosa como ACP no permeable. Diferentes letras (a; b; c) indican diferencias significativas entre tratamientos.

lo cual coincide con lo descrito por distintos autores en más de una especie^{19, 14}.

Los folículos primordiales resultaron más resistentes que los primarios, tanto en las pruebas de toxicidad como frente a la vitrificación. Este hecho, que concuerda con lo descrito en la bibliografía¹², podría deberse a que los folículos primordiales se caracterizan por encontrarse en

estado de quiescencia, mientras que los folículos primarios ya han comenzado una etapa de diferenciación y crecimiento, lo que los hace metabólicamente más activos y, por ende, más sensibles al efecto tóxico de los distintos ACP y a las bajas temperaturas.

En el caso de los folículos primordiales porcinos, los experimentos realizados determinaron

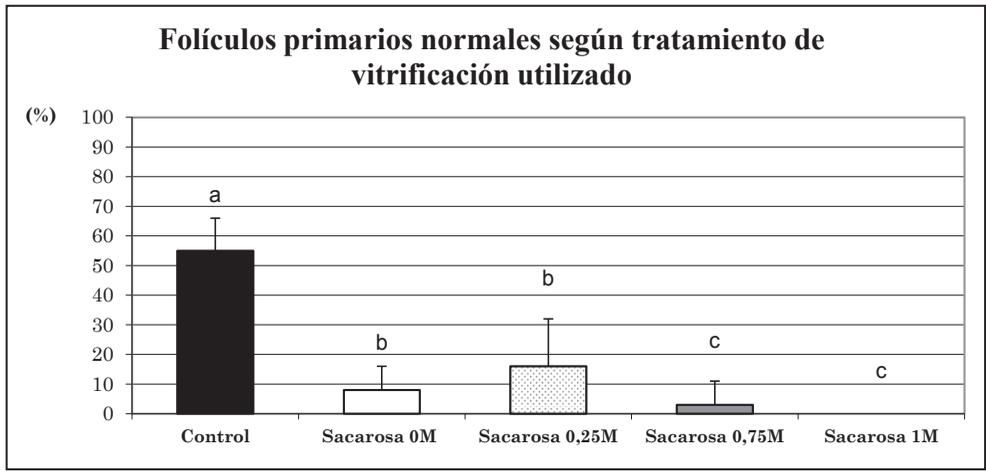


Gráfico 5. Porcentaje promedio de folículos primarios normales luego de ser sometidos a vitrificación utilizando 30% Etilenglicol y diferentes concentraciones de sacarosa como ACP no permeable. Diferentes letras (a; b; c) indican diferencias significativas entre tratamientos.

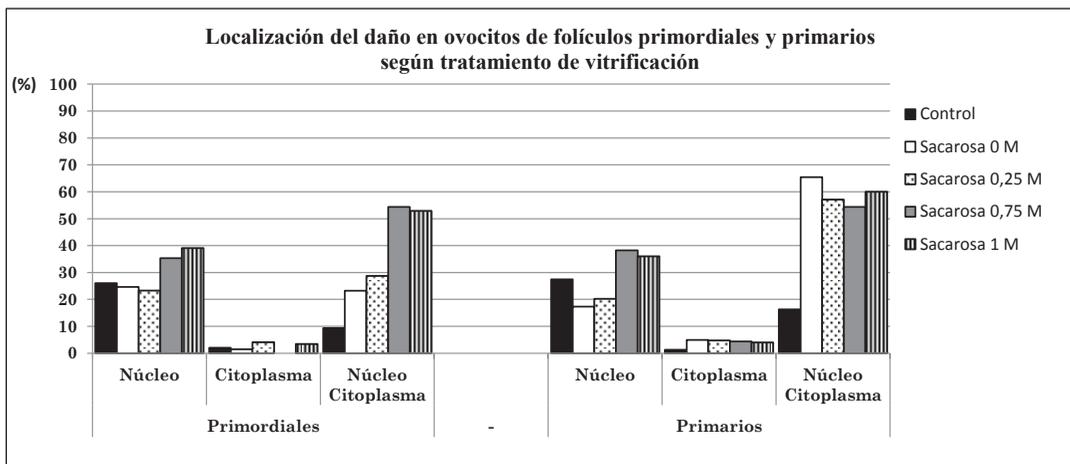


Gráfico 6. Gráfico ilustrando la frecuencia de localización del daño en ovocitos de folículos Primordiales y Primarios sometidos al proceso de vitrificación con 30% de etilenglicol y diferentes concentraciones de sacarosa. Valores expresados en porcentaje.

que el DMSO tendría un efecto deletéreo mayor, mientras que el etilenglicol sería el ACP permeable de elección ya que permitió conservar mejor la estructura histológica. Si bien la bibliografía muestra resultados contradictorios (caprino¹⁹, humano¹³, ovino¹), es importante tener en cuenta que existen diferencias especie-específicas en las propiedades de las membranas de las células ováricas²², haciendo que en algunos casos la permeabilidad de los

distintos agentes crioprotectores varíe en función de la especie estudiada.

En cuanto a la vitrificación en presencia de sacarosa, se observó que el porcentaje de folículos dañados fue mayor al emplear concentraciones más elevadas. Estas alteraciones morfológicas podrían ser consecuencia de la intensa deshidratación ocasionada por la elevada osmolaridad de las soluciones de vitrificación. Si

Tabla 2. Porcentaje de folículos que presentaron ovocito degenerado (OD), células de la granulosa degeneradas (CGD) o ambas lesiones (OD y CGD). Porcentaje de ovocitos con citoplasma dañado (vacuolización y/o eosinofilia). Valores correspondientes al total de folículos primordiales y primarios evaluados (393 y 377, respectivamente) sometidos a tratamiento de vitrificación con 30% de etilenglicol y diferentes concentraciones de sacarosa.

		Localización de Lesiones en Folículos (%)			Daño Citoplasmático en Ovocitos (%)
		OD	CGD	OD y CGD	
Primordiales	Control	24	1	13	10
	Sacarosa 0M	19	1	30	25
	Sacarosa 0,25M	18	0	40	33
	Sacarosa 0,75M	31	0	56	54
	Sacarosa 1M	17	2	78	56
Primarios	Control	26	1	18	16
	Sacarosa 0M	12	4	73	16
	Sacarosa 0,25M	11	2	71	15
	Sacarosa 0,75M	22	0	75	20
	Sacarosa 1M	16	0	84	26

bien no se observaron diferencias significativas en ausencia de sacarosa o utilizando bajas concentraciones de este azúcar (0,25M), no se puede descartar que la misma tenga efecto a nivel ultraestructural. Se observó un incremento en el daño citoplasmático en los ovocitos de folículos primordiales al aumentar la concentración de sacarosa presente en la solución de vitrificación. Este daño, principalmente el aumento de la eosinofilia, podría reflejar alteraciones a nivel de las membranas mitocondriales, evento previo a un proceso necrótico. Nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Moniruzzaman *et al.*¹⁶ quienes sugieren que el agregado de bajas concentraciones de sacarosa al medio de vitrificación (hasta 0,25M) aumenta la cantidad de folículos preantrales normales al descongelado. Sin embargo, concentraciones mayores (0,50M) incrementan el número de ovocitos y células de la granulosa anormales aún en las muestras que no fueron sometidas a la vitrificación. Estos autores utilizan un sistema de vitrificación comercial conocido como Cryotopsheet (Kitazato, Shizouka, Japan). Sin embargo, otros autores describieron que la combinación de etilenglicol o dimetilsulfóxido con sacarosa (0,5M) ayuda a mantener la

morfología de FPA caprinos, cuando estos son vitrificados tanto por el método tradicional como al vitrificar con el sistema de superficie sólida (SSV)²³.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que, en la especie porcina, el estadio folicular más resistente sería el de folículo primordial. Para nuestro sistema de trabajo (vitrificación de láminas de corteza ovárica en criotubos), el mejor medio para la vitrificación resultó ser TCM 199-Hepes con agregado de 30% de etilenglicol, 20% de suero fetal bovino 0 o 0,25M de sacarosa.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. A. Claver y a la Lic. D. Chan por su asesoramiento. Este trabajo se realizó con el aporte de la Universidad de Buenos Aires, subsidios UBACyT V008 y 20020100100811.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amorim CA.; Rondina D.; Lucci CM.; Gonçalves PBD.; Figueiredo JR.; Giorgetti A. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. *Fértil Steril.* 2006; 85: 1077-1081.

2. Borges EN.; Silva RC.; Futino DO.; *et al.* Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*. 2009; 59: 195-200.
3. Chen SU.; Lien YR.; Chao KH.; Ho HN.; Yang YS.; Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing – a review article. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2003; 202: 101 – 107.
4. Danso KE.; Ford-Lloyd BV. Cryopreservation of embryogenic calli of cassava using sucrose cryoprotection and air desiccation. *Plant Cell Rep*. 2004; 22: 623-631.
5. Fabbri R.; Pasquinelli G.; Keane D.; Magnani V.; Paradisi R.; Venturoli S. Optimization of protocols for human ovarian tissue cryopreservation with sucrose, 1,2-propanediol and human serum. *Reprod Biomed Online*. 2010; 221: 819-828.
6. Fuku E.; Xia L.; Downey BR. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*. 1995; 32: 139 – 156.
7. Gandolfi F.; Paffoni A.; Papasso Brambilla E.; Bonetti S.; Brevini TAL.; Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative análisis between human and animal models. *Fertil Steril*. 2006; 85 (1): 1150-6.
8. Gardner DK.; Sheehan CB.; Rienzi L.; Katz-Jaffe M.; Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 2007; 67: 64–72.
9. Gosden RG. Low temperature storage and grafting human ovarian tissue. *Mol. Cell. Endocr*. 2000; 163: 125 – 9.
10. Gosden RG.; Baird DT.; Wade JC.; Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum Reprod*. 1994; 9: 597-603.
11. Gunasena KT.; Critser JK. Utility of viable tissues ex vivo, in Reproductive Tissue Banking: *Scientific Principles*. Academic Press, USA. 1997; 1 - 21.
12. Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10: 229-234.
13. IsachenkoE.; Isachenko V,Ramihi G.; Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet GynecolReprod Biol*. 2003; 108: 183-196.
14. Kagawa N.; Silber S.; Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online*. 2009; 18: 568-77.
15. Larman MG.; Sheehan CB.; Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in Mouse oocytes. *Reproduction*. 2006; 131: 53-61.
16. Moniruzzaman M.; Bao RM.; Taketsuru H.; Miyano T. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*. 2009; 72: 280-288.
17. Newton H.; Aubard Y.; Rutherford A.; Sharma V.; Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum. Reprod*. 1996; 11: 1487 – 91.
18. Oktay K.; Newton H.; Aubard Y.; Salha O.; Gosden RG. Cryopreservation of immature human oocytes and ovatian tissue: An emerging technology? *Fetil. Steril*. 1998; 354: 1-7.
19. Rodrigues APR.; Amorim CA.; Costa SHF.; et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci*. 2004; 84: 211-227.
20. Rodriguez-Wallberg KA.; Oktay K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* (2012), doi: 10.1016/j.jpbogyn.2012.01.001.
21. Santos RR, Tharasanit T.; Figueiredo JR.; Van Haeften T.; Van den Hurk R. Preservation of caprine preantral follicles viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res*. 2006; 325: 523-531.

VITRIFICACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO PORCINO

22. Santos RR.; Amorim C.; Cecconi S.; et al. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science*. 2010; 122: 151–163.
23. Santos RR.; Tharasanit T.; Van Haeften T.; Figueiredo JR.; Silva JRV.; Van den Hurk R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell. Tissue Res*.2007; 327: 167-176.
24. Shaw JM.; Oranratnachai A.; Trouson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* .2000; 53: 59-72.
25. Smitz JEJ.; Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* .2002; 123: 185-202.
26. Vicent C.; Pickering SJ.; Johnson MH. The hardening effect of DMSO on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte ad is associated with the reduction in the number of cortical granules present. *J. Reprod. Fertil*. 1990; 87: 253 – 259.
27. Zhang JM.; Liu XL.; Yang YX.; Wang XP. Comparisons of different protocols for vitrifying mouse ovarian tissue. *Reprod Domest Anim* .2010; 45: 694-698.
28. Zito, M.; Evans, S.; Weldon, P.J. Owl monkeys (*Aotus* spp.) self-anoint with plants and millipedes. *Folia Primatol* 2003; 74:159–161.

