



**Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	3
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	6
4. METODOLOGÍA.....	6
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	7
5.1. Liofilización: método alternativo .....	7
5.1.1. Historia de la liofilización.....	7
5.1.2. Liofilización como herramienta en la biotecnología de la reproducción .....	7
5.1.3. Fundamentos del proceso de liofilización .....	11
5.1.4. Daños ocasionados durante la congelación/ vitrificación .....	13
5.1.5. Daños ocasionados durante la liofilización, el secado.....	14
5.1.6. Daños ocasionados durante el almacenamiento .....	14
5.1.7. Daños ocasionados durante la rehidratación .....	15
5.2. Variables que tienen influencia sobre los resultados de la liofilización.....	16
5.2.1. LIOPROTECTORES .....	17
5.2.1.1. Azúcares .....	19
5.2.1.2. Proteínas .....	21
5.2.1.3. Glicerol .....	23
5.2.1.4. Lípidos .....	24
5.2.1.5. Resveratrol .....	24
5.2.2. AGENTES QUELANTES.....	25
5.2.3. ANTIOXIDANTES.....	26
5.2.3.1. Arbutina .....	26
5.2.3.2. Epigalocatequingalato (EGCG).....	26
5.2.3.3. Ácido rosmarínico .....	26
5.2.4. GRADO DE MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS A LIOFILIZAR.....	27
5.2.5. INFLUENCIA DE CÉLULAS DEL CÚMULUS <i>OOPHPORUS</i> .....	28
5.2.6. CONDICIONES DE LIOFILIZACIÓN.....	29
5.2.7. TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO .....	30
6. CONCLUSIONES .....	31
CONCLUSIONS .....	32
7. VALORACIÓN PERSONAL .....	32
8. BIBLIOGRAFÍA.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS

### FIGURAS

Figura 1: Espermatozoides liofilizados .....	8
Figura 2: Diagrama de fases del proceso de liofilización .....	11
Figura 3: Condiciones del punto triple del agua .....	12
Figura 4: Liofilizador SAI Unizar .....	14
Figura 5: Tardígrado .....	14
Figura 6: Rehidratación ovocitos liofilizados .....	16
Figura 7: Estructura química de la trehalosa y sacarosa .....	19
Figura 8: Efecto de resveratrol en la compactación de VG (a), y tasa de supervivencia después de la transferencia de VG (b) .....	25
Figura 9: Vesícula germinal (VG) liofilizada con envoltura nuclear intacta tras la rehidratación .....	27
Figura 10. VG de un ovocito liofilizado y posteriormente rehidratado .....	28
Figura 11: ovocitos con (1) y sin (2) <i>cúmulus oophorus</i> .....	28

### TABLAS

Tabla 1: Lioprotectores y su acción .....	18
---	----

## 1. RESUMEN

El número de especies animales en peligro de extinción aumenta de manera alarmante cada año y las biotecnologías de la reproducción se han convertido en una herramienta imprescindible para preservar la biodiversidad animal. Hoy en día el método convencional de preservación del germoplasma (espermatozoides, ovocitos, embriones, células somáticas ó ADN) es la congelación con nitrógeno líquido. A lo largo del tiempo este método ha demostrado su eficacia, pero actualmente se están buscando alternativas a su uso, dado el coste que conlleva y su baja sostenibilidad. Tras haber demostrado su eficacia en su uso en espermatozoides, la liofilización se plantea como nuevo método de preservación de material genético de ovocitos. Esta revisión bibliográfica tiene como objetivo determinar hasta qué punto la liofilización de ovocitos se puede considerar como un método alternativo a la conservación de ovocitos mediante métodos convencionales así como, determinar qué variables tienen mayor influencia sobre los resultados de la liofilización. Para contestar a los objetivos planteados se realiza una revisión bibliográfica. En base a los estudios que hay hasta el momento, todavía no existen suficientes resultados al respecto como para considerarla una técnica alternativa a la criopreservación. Además, muchas variables tienen influencia sobre los resultados de la liofilización y parecen ser los compuestos utilizados como lioprotectores, el estado de maduración de los ovocitos y las condiciones de liofilización los factores que se tienen que estudiar con más detalle en un futuro, ya que parecen campos prometedores a explorar para mejorar el éxito de esta técnica. No obstante, ya existe alguna aplicación comprobada como por ejemplo la posibilidad de transferencia de vesículas germinales (VG) procedentes de ovocitos liofilizados para producir ovocitos que se activan por partenogénesis y se convierten en embriones.

## ABSTRACT

The number of endangered animal species is increasing at a rapid pace every year and reproductive biotechnologies became a crucial tool for preserving animal biodiversity. Today, the conventional method of preserving germplasm (spermatozoa, oocytes, embryos, somatic cells or DNA) is freezing with liquid nitrogen. This method has been proven effective over time, but we are seeking alternatives because of its high cost and low sustainability. Having demonstrated the effectiveness of freeze-drying in its use with spermatozoa, it is being considered as a new method of preserving oocyte genetic material. The aim of this literature review is to determine to what extent oocyte freeze-drying can be considered as an alternative method to oocyte preservation by conventional methods, as well as to determine which variables have the greatest influence on the results of freeze-drying. To reach these goals, a literature review was carried out. Based on the studies that exist so far, there are still not enough results to consider it an alternative technique to cryopreservation. Also, many variables have

an influence on the results of freeze-drying and it seems that the compounds used as lyoprotectants, the state of oocyte maturation and the freeze-drying conditions are the factors that most influence the results of freeze-drying. However, there are already some proven applications, such as the possibility of transferring germinal vesicles (GV) from lyophilized oocytes to produce oocytes that are activated by parthenogenesis and become embryos.

## 2. INTRODUCCIÓN

El ritmo actual de extinción de especies es creciente debido a la actividad antropogénica: el deterioro del medio, el cambio climático y el colapso ecológico. El campo de la conservación de la genética pretende preservar las especies utilizando un mayor nivel de diversidad genética, puesto que ello conlleva una mayor supervivencia de las especies a largo plazo (**Teixeira y Huber, 2021**). En los últimos años se ha hecho necesario conocer estrategias complementarias que ayuden a la preservación de estas especies, y ha ido aumentado por tanto el interés por nuevas técnicas de conservación que faciliten el almacenamiento a largo plazo de células germinales y tejidos gonadales de una forma sencilla. Con el éxito de la biología de la criopreservación, se están creando cada vez más bancos de germoplasma, conjunto de genes que se transmiten a la descendencia por medio de células reproductoras y que permiten perpetuar una especie, para almacenar muestras biológicas como espermatozoides, ovocitos, embriones, células somáticas ó ADN (**Dang-Nguyen et al., 2018**).

A lo largo del tiempo la criopreservación ha demostrado su eficacia, pero actualmente se están buscando alternativas más ventajosas, dado el coste que conlleva y su baja sostenibilidad. Investigaciones recientes indican que las estructuras y funciones de los gametos o tejidos gonadales pueden conservarse a largo plazo utilizando diferentes estrategias basadas en la deshidratación. De hecho, la liofilización o secado de células es el método más utilizado para la desecación de germoplasma. Para llevar a cabo esta técnica es preciso congelar primero las células a procesar, para pasar después a un secado por sublimación del hielo implicando una transición directa de una fase sólida a gaseosa (**Loi et al., 2021**). Diversos estudios han demostrado su eficacia en espermatozoides y células somáticas. No obstante, aunque aún queda mucho por investigar para optimizar las condiciones de secado y rehidratación para cada tipo de muestra y cada especie, se cree que los métodos de conservación alternativos cambiarán el paradigma de la conservación de la fertilidad y de los biobancos, sin embargo, se necesitan más estudios sobre la rehidratación (**Comizzoli et al., 2022**). Quizá orientando las técnicas de congelación pensando en la liofilización podrían lograrse mejores resultados en la misma, de ahí la relevancia de conocer de qué manera conseguirlo.

Hoy en día los avances en la preservación son muy relevantes, puesto que la conservación a largo plazo de células vivas de buena calidad es esencial en muchas disciplinas científicas. El uso de células terapéuticas está muy extendido y tiene muchos campos de aplicación como la transferencia de células madre, la cicatrización de heridas o la reproducción (**Rockinger et al., 2021**). La conservación de espermatozoides, óvulos, embriones y tejidos gonadales viables tiene un impacto significativo en la reproducción asistida humana. La creciente evidencia de los resultados satisfactorios obtenidos con la

técnica de vitrificación de ovocitos ha contribuido en gran medida a su aplicación en el campo de la preservación de la fertilidad. La fecundación *in vitro* (FIV) es un procedimiento terapéutico de reproducción asistida en el cual la fecundación (unión del óvulo con un espermatozoide) se produce en una placa petri en un laboratorio, en vez de en los oviductos del tracto reproductivo. Centrándonos en la tecnología de la criopreservación de ovocitos, hay que resaltar que conlleva una serie de ventajas en los programas de FIV. Los beneficios de la reserva criogénica de ovocitos incluyen mayor flexibilidad a la hora de almacenar el exceso de ovocitos para ser utilizados en ciclos posteriores de FIV, por lo tanto, reduce el número de ciclos de estimulación ovárica (**Tharasanit y Thuwanut, 2021**).

En humana, gracias a la criopreservación se puede evitar la transferencia de embriones múltiples para lograr un embarazo, reduciendo así el riesgo relacionado de embarazo múltiples (**Levi-Setti et al., 2016**), ya que los embriones sobrantes pueden ser almacenados. Da apoyo también a los programas de donación de ovocitos, ya que supone poder guardarlos, lo que también implica proteger la fertilidad de mujeres que corren el riesgo de perder su fertilidad por razones médicas, como las pacientes con cáncer o las mujeres diagnosticadas de endometriosis o que por razones personales no médicas desean retrasar la maternidad. En humana, la edad al momento de la extracción de ovocitos, la presencia de una enfermedad o el número de ovocitos por paciente afectan fuertemente al pronóstico reproductivo después de la preservación de la fertilidad (**Cobo et al., 2021**). El daño ovárico que conduce a la infertilidad es un efecto adverso frecuente de la quimioterapia y/o radioterapia, por lo tanto, la preservación de la fertilidad se ofrece cada vez más antes del inicio del tratamiento oncológico a las mujeres diagnosticadas de cáncer. La criopreservación de ovocitos se considera ahora una herramienta prometedora que podría motivar a las mujeres infértilas a preservar su material genético (**Diaz-Garcia et al., 2018**). También hay que tener presente que resulta de interés para la conservación de poblaciones animales y especies salvajes, y la creación de modelos biomédicos mediante el uso de animales de laboratorio (**Saragusty et al., 2020**).

La criopreservación es la conservación de material biológico a bajas temperaturas ( $T_a$ ), y para ello disponemos de dos métodos: la refrigeración y la congelación, ya sea mediante el protocolo clásico de congelación lenta o mediante la vitrificación. La vitrificación es una técnica de congelación ultrarrápida que consiste en la solidificación de un líquido sin la formación de cristales de hielo, dando lugar a un sólido amorfo gracias a la utilización de agentes crioprotectores en altas concentraciones. De esta manera las células podrán ser conservadas a  $T_a$  de -196°C, utilizando nitrógeno líquido ( $NL_2$ ). La vitrificación es una valiosa técnica que ha demostrado ser eficaz en varios estudios para la conservación permanente y el transporte a larga distancia de todo tipo de células, incluyendo células de animales genéticamente modificados, células germinales, espermatozoides y embriones. En 1938 Luyet y Hodapp publicaron el primer informe sobre la criopreservación de espermatozoides mediante

vitrificación y la primera vitrificación exitosa de embriones de ratón fue lograda aplicando una mezcla de DMSO, acetamida y polietilenglicol en la pajuela sumergida en NL<sub>2</sub> (**Rall y Fahy, 1985**).

Hasta la fecha se dispone de germoplasma criopreservado en mamíferos de numerosas especies: aproximadamente 115 especies cuentan con espermatozoides criopreservados y unas 52 especies con embriones. Están descritos nacimientos con descendencia viva a partir de espermatozoides preservados en aproximadamente una quinta parte de estas especies y de embriones criopreservados en la mitad de ellas. Sin embargo, son pocas las especies silvestres en las que se han conseguido éxitos, lo que necesita ser mejorado a futuro (**Saragusty y Loi, 2019**).

Con temperaturas inferiores a -130°C, las reacciones químicas en el interior de la célula se detienen. Sin embargo, el mantenimiento de las células a estas temperaturas no está exento de riesgos, como alteraciones en el mantenimiento de la T<sup>a</sup> de forma estable, o la contaminación cruzada con el NL<sub>2</sub> que puede conllevar a la muerte de las células (**Rockinger et al., 2021**). Mantener la biodiversidad es una tarea esencial, pero almacenar células germinales como recursos genéticos utilizando NL<sub>2</sub> es difícil y costoso (**Wakayama et al., 2022**). Los ultracongeladores electrónicos y los contenedores de NL<sub>2</sub> requieren una vigilancia constante, un complejo mantenimiento, un sistema de alarma y unas salas especializadas equipadas con energía de reserva y un entorno controlado. Por desgracia estas instalaciones son caras y no están disponibles en todas las regiones del mundo. Además, los sistemas de crioconservación son propensos a fallos, lo que recientemente ha provocado pérdidas de muestras en clínicas de fertilidad humana y laboratorios de investigación (**Pomeroy et al. 2019, Letterie y Fox 2020**). Todo ello ha llevado a que los investigadores hayan ido buscando alternativas para almacenar de forma segura y eficiente los germoplasmas para su uso posterior en programas de preservación de la fertilidad (**Comizzoli et al., 2022**). La deshidratación, y en particular la liofilización como método de conservación, podría ser una alternativa al ofrecer una mayor estabilidad de la muestra sin necesidad de usar temperaturas tan bajas, lo que implicaría un transporte más fácil, así como unos tiempos de reconstitución controlados y rápidos (**Rockinger et al., 2021**).

### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Dada la situación actual del método convencional de preservación del germoplasma, se hace necesario encontrar alternativas más sostenibles. La liofilización se está planteando como una buena opción, puesto que el material liofilizado no requiere condiciones especiales de mantenimiento. La liofilización es una técnica que ya ha demostrado su validez en espermatozoides de diferentes especies y en células somáticas. Actualmente se está valorando si podría utilizarse como un método de conservación de ovocitos pero teniendo en cuenta su gran tamaño, los resultados todavía no son exitosos.

Con el desarrollo de este trabajo se pretende:

- Determinar hasta qué punto la liofilización de ovocitos se puede considerar como un método alternativo a la conservación de ovocitos mediante métodos convencionales interpretando las posibles aplicaciones y límites de su uso como tecnología de reproducción en el ámbito veterinario.
- Determinar qué variables tienen mayor influencia sobre los resultados de la liofilización.

### **4. METODOLOGÍA**

Para llevar a cabo los objetivos planteados se ha realizado una revisión bibliográfica. Las bases de datos utilizadas para recopilar la información plasmada en este trabajo han sido las siguientes:

- Pubmed
- Google Scholar
- Web of Science
- Alcorze

La búsqueda bibliográfica ha sido realizada utilizando las siguientes palabras clave: "oocyte", "lyophilization", "freeze-dried", "gamete preservation"

La información reflejada en este trabajo ha sido seleccionada e incluida en función de su fecha de publicación, centrándonos en los últimos 15 años. Además, la bibliografía utilizada en la realización de este trabajo se citará siguiendo las reglas APA tal y como se indica en la guía docente de la asignatura.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Liofilización: método alternativo

#### 5.1.1. Historia de la liofilización

La liofilización es la deshidratación bajo condiciones particulares. Comienza con la congelación de la muestra seguida de una evaporación al vacío eliminando por sublimación casi todo el contenido de agua de la muestra procesada. El producto obtenido por liofilización es un polvo o una sustancia dura y porosa que necesita ser conservada en envases herméticamente sellados. Cuando se le restituye la cantidad de agua evaporada, el producto reproduce de una forma similar a la inicial su aspecto y sus propiedades originales (**Alzate y Eduardo, 2008**). En 1943 Alexander Fleming propuso el nombre de liofilización a esta técnica, ya empleada por diferentes civilizaciones como los vikingos (**Talburt y Smith, 1975**).

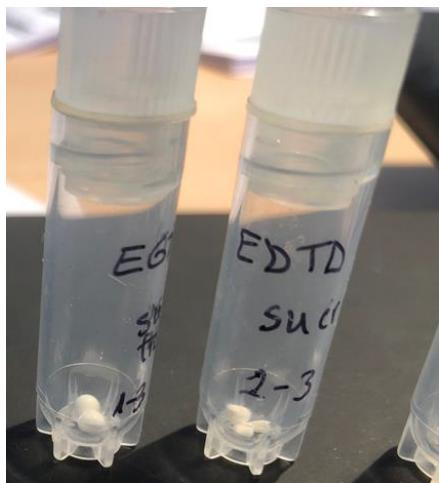
La industria farmacéutica utilizó por primera vez el proceso de liofilización en 1909 y los primeros estudios que tenían como objetivo la preservación de células por deshidratación se llevaron a cabo en bacterias, virus y hongos (**Flosdorf y Mudd, 1935**). A partir de entonces, han sido numerosos los proyectos que han utilizado este método de preservación con microorganismos, tejidos animales, drogas, plasma sanguíneo y antibióticos (**Flosdorf y Kimball, 1939**).

Las investigaciones sobre la liofilización de alimentos se iniciaron antes de la Segunda Guerra Mundial, sin embargo, esta técnica se incorporó como un elemento esencial de conservación en la industria alimentaria a partir del año 1958, empezando principalmente con el café soluble (**Alzate y Eduardo, 2008**). Hoy en día la liofilización se utiliza ampliamente en la industria alimentaria y farmacéutica como técnica de conservación a largo plazo, y a lo largo de los años se han ido aportando nuevos conocimientos. No obstante, posiblemente debido a que no ha habido suficientes interacciones entre las industrias mencionadas y los investigadores implicados en la liofilización de células y tejidos de mamíferos, los conocimientos de las primeras no ha llegado a tener reflejo en los avances de los segundos (**Saragusty y Loi, 2019**).

#### 5.1.2. Liofilización como herramienta en la biotecnología de la reproducción

La evolución de la conservación está ligada a la evolución de las biotecnologías reproductivas. En general el objetivo de cualquier tipo de deshidratación es permitir el almacenamiento a largo plazo (**Rockinger et al., 2021**). La liofilización fue utilizada por primera vez en el campo de la reproducción por **Polge et al. (1949)** para preservar esperma de ave. Posteriormente, **Sherman (1954)** la aplicó en

semen humano y **Bialy y Smith (1957)** la emplearon en semen bovino. En **1998**, **Wakayama y Yanagimachi** lograron producir con éxito la primera descendencia viva a partir de espermatozoides liofilizados (**Figura 1**) y posterior desarrollo embrionario mediante la técnica de inyección



**Figura 1.** Espermatozoides liofilizados (Noelia González)

intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) de ratón, conservado a T<sup>º</sup> ambiente durante tres meses. Posteriormente, con esta técnica se consiguió producir crías viables de muchas especies incluyendo ratones (**Wakayama y Yanagimachi 1998; Kusakabe et al., 2001; Kaneko et al., 2003**), conejos (**Liu et al., 2004**), caballos (**Choi et al., 2011**) y hámsteres (**Muneto y Horiuchi, 2011**). Estos autores demostraron, por lo tanto, que aunque los espermatozoides no sobrevivieron a la deshidratación, la capacidad de su núcleo para iniciar el desarrollo embrionario fue normal, de hecho se ha confirmado que un espermatozoide muerto puede tener un ADN viable. Se han conservado espermatozoides de muchas especies utilizando

la liofilización y todos los estudios tuvieron que utilizar la ICSI para su posterior utilización tras la rehidratación, ya que los espermatozoides pierden la movilidad después de la misma (**Saragusty et al., 2020**). Recientemente, espermatozoides humanos liofilizados y rehidratados utilizados para ICSI, han dado lugar a la producción de blastocistos euploides normales (**Alexandrova et al., 2020**).

En general, los estudios indican que la liofilización resulta exitosa en el caso de los espermatozoides. Son células pequeñas, con poco contenido de agua y tienen una cromatina altamente condensada, lo que los hace buenos candidatos para una deshidratación reversible con resultados positivos (**Saragusty y Loi, 2019**). Tras el éxito obtenido en la liofilización de espermatozoides, las investigaciones han ido ampliando sus miras hacia otro tipo de células más grandes como son las células somáticas y los ovocitos. Desafortunadamente la situación es mucho más compleja en el caso de los ovocitos, ya que su gran tamaño dificulta el proceso de deshidratación sin que éstos sufran lesiones (**Loi et al., 2021**). Sin embargo, el propósito sigue siendo el mismo: el estudio del potencial de la liofilización como un método de conservación celular.

En **2008**, **Loi et al.** mostraron por primera vez que la liofilización era un método eficaz de almacenamiento para células diferentes a los espermatozoides. Tras su almacenamiento en estado deshidratado a temperatura ambiente durante tres años, las células somáticas utilizadas como núcleos en el proceso de transferencia nuclear son capaces de dirigir el desarrollo embrionario de los ovocitos enucleados hasta el estadio de blastocisto. Se ha demostrado que al igual que con los

espermatozoides, tras el proceso de liofilización las células quedan muy dañadas pero su material nuclear permanece viable y es posible su posterior transferencia nuclear a un ovocito receptor.

En el estudio de **Wakayama et al. (2022)** se consiguió obtener clones sanos y fértiles a partir de células somáticas liofilizadas, lo cual sugiere que la técnica de liofilización puede ser útil para el establecimiento de soluciones alternativas a los biobancos de NL<sub>2</sub>, resultando más barata y más segura. Utilizando células somáticas liofilizadas como donantes nucleares para la reclonación obtuvieron ratones sanos con una tasa de éxito del 0,2 al 5,4%.

Por tanto, los objetivos principales de la deshidratación de células para generar embriones residen en dos nichos principales en la industria de las tecnologías de la reproducción. El primero sería el de los biobancos de espermatozoides liofilizados y el segundo sería el de células somáticas y ovocitos. Los gametos pueden utilizarse para la fecundación *in vitro*, seguida del cultivo y transferencia de embriones obtenidos, pero en la actualidad, el proceso completo de gametogénesis *in vitro* solo se ha demostrado en ratones (**Saragusty y Loi, 2019**).

En el año **2012, Patrizio et al., Loi et al. y Arav** llevaron a cabo dos estudios de liofilización ovocitaria, unos con ovocitos bovinos y otros con ovocitos ovinos. En el estudio sobre ovocitos bovinos se observó una mayor recuperación de ovocitos en M-II madurados *in vitro* incluyendo las células del cúmulo en el caso de la criopreservación mediante vitrificación frente a la congelación lenta. Confirmaron que la congelación ultrarrápida es un método esencial, no solo para la conservación en NL<sub>2</sub> sino también para una conservación en estado seco posterior a la criopreservación.

En el estudio sobre ovocitos ovinos consiguieron que un 19% del total de los ovocitos en M-II madurados *in vitro* y un 33% de los que habían sobrevivido se desarrollaran hasta fase de mórula. Por lo tanto, se llegaría a la conclusión de que los cromosomas de ovocitos ovinos liofilizados pueden impulsar el desarrollo embrionario temprano una vez inyectados en ovocitos frescos y enucleados. La liofilización es una innovación revolucionaria pionera para los biobancos de gametos (**L. Loi et al., 2012; Patrizio et al., 2012, Arav, 2012**)

Los estudios tanto en células somáticas como en espermatozoides han demostrado repetidamente que el ADN de las células deshidratadas permanece en gran medida intacto durante el proceso de deshidratación-rehidratación, particularmente con respecto a las roturas de doble cadena. Es conocido que el ovocito tiene una serie de vías de reparación del ADN. Estas vías se activan cuando, tras la fecundación, el ovocito presenta daños en los sitios básicos estructurales o roturas de ADN. Naturalmente, si los daños superan cierto umbral o si están presentes en sitios críticos, el cigoto eventualmente progresará hacia la apoptosis. Sin embargo, cuando sea posible, activará las vías de reparación pertinentes para alcanzar una molécula de ADN estable (**Ménézo et al., 2010**).

Una de las principales razones de las bajas tasas de éxito de la liofilización de ovocitos es que la membrana celular y las estructuras del ADN se dañan cuando las células se exponen al procedimiento

(Dang-Nguyen et al., 2018). A pesar de la poca información publicada acerca de la deshidratación ovocitaria, en comparación con los espermatozoides, los datos confirman indirectamente las dificultades para su deshidratación (Loi et al., 2021).

Además de ovocitos también se han realizado estudios de liofilización de otro tipo de productos utilizados en los protocolos de maduración ovocitaria *in vitro*, como por ejemplo el de García y Romar (2017), quienes comprobaron el efecto que tiene el uso de fluido folicular liofilizado en la maduración ovocitaria *in vitro*. El fluido folicular es un aditivo empleado rutinariamente por la mayoría de los laboratorios que trabajan con técnicas de reproducción asistida. Sus resultados mostraron que al adicionar fluido folicular porcino liofilizado el porcentaje de ovocitos que maduraban correctamente llegando al estadio de metafase II (M-II) disminuía hasta el 54 %, frente al 68.7% obtenido con los suplementos convencionales que utilizan fluido folicular sin liofilizar. Además, el porcentaje de ovocitos degenerados y detenidos en estadio de VG se vio incrementado con el uso del fluido folicular liofilizado. Por todo ello, parece que de momento no sería una buena alternativa.

Por último, comentar que también se han hecho intentos para liofilizar tejido ovárico ya que contiene grandes reservas de ovocitos inmaduros encerrados en folículos primordiales, el tejido ovárico se convierte en un objeto atractivo para la preservación de la fertilidad. Sin embargo, son estudios que aún están en curso y hasta la fecha se han ofrecido datos muy limitados, solo Lee et al. en 2019 describieron una preservación en seco exitosa de tejido ovárico de gato. Se realizó un diseño experimental sobre biopsias de corteza ovárica que se expusieron a varias concentraciones de trehalosa y se secaron utilizando protocolos de deshidratación asistida por microondas bajo control térmico. El proceso no afectó la morfología ni la integridad del ADN de los folículos ni de las células estromales. Además, la actividad transcripcional y la supervivencia de los folículos se mantuvieron parcialmente después de 10 minutos de secado, lo que ya era compatible con el almacenamiento a temperaturas no criogénicas. Más tarde, en 2021 Bebbere et al. intentaron liofilizar tejido ovárico ovino. Los resultados obtenidos por Bebbere et al. (2021) indicaron que al menos una parte del tejido ovárico toleraba el protocolo de conservación, pero desafortunadamente describieron altos niveles de degradación del ADN, así como un alto número de alteraciones morfológicas progresivas tanto en el componente folicular como en el intersticial y estromal. Aproximadamente el 80% de los folículos primarios y el 90 al 100% de los secundarios se caracterizaron por un desprendimiento multifocal de las células de la granulosa de la membrana basal. Sin embargo, histológicamente, el tejido conservó sus características microscópicas generales lo que permitió la identificación de los principales tipos celulares. No obstante, los resultados muestran que el tejido ovárico de oveja puede tolerar el protocolo de liofilización aplicado, lo cual proporcionó pistas para posteriores opciones de mejora del

procedimiento de almacenamiento con el objetivo final de optimizar la viabilidad del tejido después de la rehidratación.

Con lo anteriormente descrito, podemos plantear que los resultados obtenidos en distintos estudios realizados sobre la liofilización han demostrado que este procedimiento presenta un futuro muy prometedor en el campo de la reproducción, ya que podría ser una alternativa más económica a la criopreservación, método más comúnmente usado en la actualidad.

### 5.1.3. Fundamentos del proceso de liofilización

La liofilización es un proceso de deshidratación mediante sublimación. El proceso de liofilización consta principalmente de dos etapas: la congelación y el secado, que a su vez se divide en secado primario y secundario (Alzate y Eduardo, 2008) (Figura 2). Independientemente de la muestra, la liofilización es un método especialmente delicado, en el cual cada una de las etapas plantea el riesgo de posibles daños celulares.

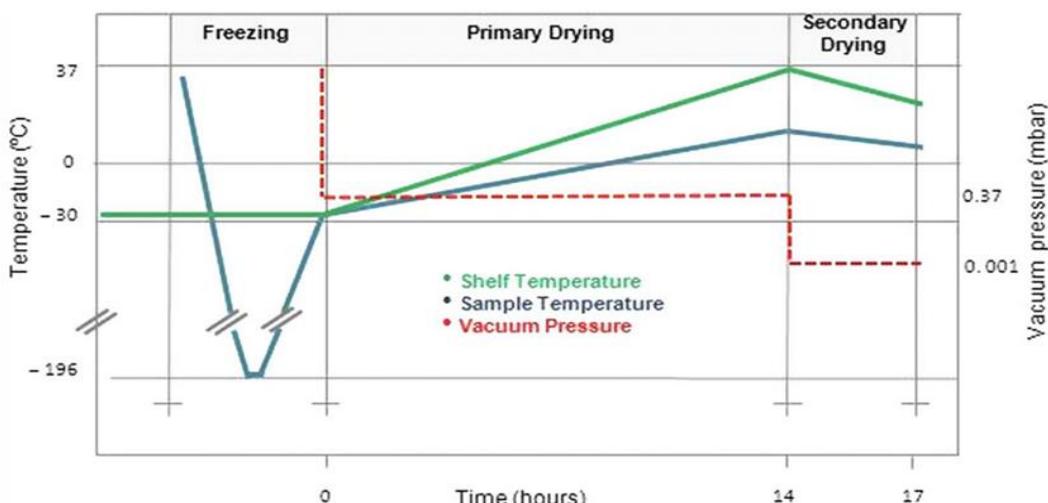


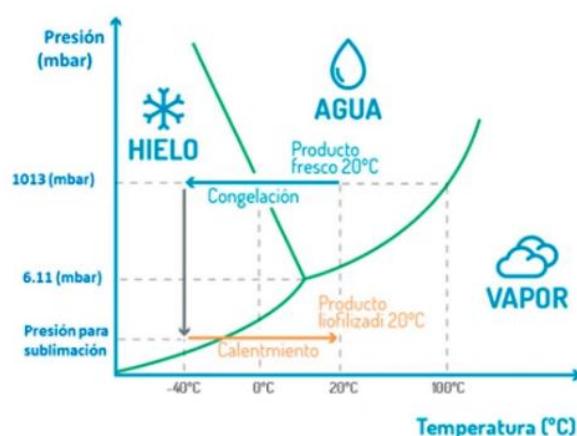
Figura 2. Esquema del proceso de liofilización en función del tiempo, temperatura y presión (Gil et al., 2014).

Las etapas más en detalle serían las que siguen:

- La primera etapa de congelación de los solutos es la transición de líquido a hielo al bajar la temperatura rápidamente por debajo del punto triple (Figura 3). El objetivo principal del proceso de congelación es la separación entre disolvente y solutos. La temperatura necesaria para conseguir la congelación completa de una muestra depende de la naturaleza del disolvente y de otros componentes de la muestra.
- Etapa de secado primario en la cual se aplica el vacío en el liofilizador y se empieza a calentar para iniciar el proceso de sublimación de los cristales de hielo. El hielo se retira de la muestra mediante sublimación desde la fase sólida a la gaseosa. El proceso de secado por sublimación se da por

acabado cuando se han eliminado todos los cristales de hielo presentes en la muestra. Cuando desaparece la última porción de hielo se empieza el incremento de la temperatura.

- Etapa de secado secundario dónde la estabilidad deseada se obtiene reduciendo el contenido de humedad en la muestra sin reducir el volumen de la muestra inicial (**Jennings, 1999**). Las porciones remanentes de agua no congelada que no subliman en la primera etapa del secado lo hacen por evaporación en la segunda etapa. Esta desorción final del agua restante se consigue gracias a la aplicación de altas temperaturas junto a una reducción de la presión de vapor de agua en el recipiente (**Weng, 2021**). La humedad residual de la muestra se reduce a contenidos de agua en torno a 0.05g H<sub>2</sub>O por g de peso seco (**Zhang et al., 2017**).



**Figura 3.** Condiciones del punto triple del agua.

Los factores más importantes y que afectan al protocolo de liofilización y por tanto que tienen un marcado impacto en el material liofilizado son la presión de vacío, la temperatura y el periodo de secado (**Jennings, 1999**). La restauración de un material liofilizado a su forma original se realiza añadiendo la cantidad de agua eliminada, lo cual se denomina rehidratación o reconstrucción (**Rockinger et al., 2021**). Todavía no se conoce cuál es la mejor manera de llevar a cabo la deshidratación, pero de momento parece que la liofilización es la técnica más utilizada. Del mismo modo, no sabemos cuál es la mejor manera de rehidratar las células. Habrá que abordar la combinación de deshidratación y rehidratación para encontrar la alternativa óptima de secado. Para lograr un secado verdaderamente reversible alcanzando un estatus similar al de la criopreservación tenemos que intentar que los procesos de secado y rehidratación sean lo más parecidos a la forma en que ocurren en la naturaleza (**Saragusty y Loi, 2019**).

Una de las principales ventajas de la liofilización es que el nitrógeno y el hielo seco ya no serían necesarios para la conservación del material y una temperatura ambiente o una temperatura de refrigeración entre 0 y 4°C sería suficiente para su almacenamiento. Sin embargo, uno de los

inconvenientes es la fragmentación del ADN (**Kusakabe et al., 2001**) junto con el estrés oxidativo causado por la liberación de radicales libres (ROS) (**Twigg et al., 1998**). Es muy probable que las membranas celulares y los orgánulos puedan dañarse durante las diferentes etapas de congelación, liofilización, almacenamiento y rehidratación ya que todas las etapas suponen factores de estrés severos e implican cambios drásticos (**Gil et al., 2014**).

#### **5.1.4. Daños ocasionados durante la congelación/ vitrificación**

Puesto que la congelación es un paso previo a la liofilización, es importante tener en cuenta los daños que conlleva sobre la muestra liofilizada (**Alzate y Eduardo, 2008**). Las actividades bioquímicas y biofísicas se suspenden en las células a temperatura de congelación, lo que permite garantizar la longevidad a largo plazo de células vivas. Sin embargo, durante la criopreservación, los germoplasmas son expuestos a diferentes daños consecuencia de la degradación acelerada de las muestras, posibles variaciones en la T<sup>a</sup> de almacenamiento y por tanto riesgo de desvitrificación y/o recristalización del hielo como consecuencia. Además, la sensibilidad y la respuesta a estos factores de estrés varían entre especies, tejidos, células, orgánulos y ADN (**Comizzoli et al., 2022**).

La congelación puede causar cambios estructurales irreversibles, por ejemplo, el daño mecánico que es causado principalmente por la formación de cristales de hielo durante el enfriamiento, que puede ser a nivel intra o extracelular, y que depende principalmente de la velocidad de enfriamiento aplicada. Normalmente, la formación de hielo empieza en el medio externo y la membrana plasmática actúa como barrera e impide el crecimiento intracelular de cristales de hielo (**Saragusty y Arav, 2011**). A medida que los cristales van creciendo, aumenta la concentración de solutos extracelulares lo que produce una presión osmótica cada vez mayor, se crea una solución hipertónica, por lo tanto, promueve la deshidratación y la toxicidad química debido a la mayor exposición a crioprotectores tóxicos, aumenta el daño mecánico, lo que incluso puede causar la muerte celular. En esta solución salina concentrada, los orgánulos celulares y las proteínas se empaquetan lo que puede conducir a la degradación de las proteínas debido a interacciones no deseadas y reacciones químicas. A velocidades de enfriamiento más altas, no hay tiempo suficiente para que el agua descienda por el gradiente químico desde el espacio intracelular más diluido hasta el espacio extracelular medio concentrado. Como consecuencia, una mayor cantidad de agua sobre enfriada permanece en el espacio intracelular y cristaliza al enfriarse (**Rockinger et al., 2021**).

### 5.1.5. Daños ocasionados durante la liofilización, el secado



**Figura 4.** Liofilizador SAI Unizar  
(Noelia González)

En el caso de la liofilización como método de secado (**Figura 4**), el agua se elimina del sistema por sublimación (**Arav, 2020**). El principal problema es el daño del ADN que se produce durante la liofilización por la acción de endonucleasas y las especies ROS (**Said et al., 2020**). La estructura general de la proteína se ve afectada durante el secado, sin embargo, después de la rehidratación, la estructura de la proteína se parece mucho a la de las células frescas. Se produce una separación de fases de la membrana causada por acumulación de productos de peroxidación de fosfolípidos, lo cual suele deberse a niveles elevados de ROS formados durante la congelación y secado (**Zhang et al., 2017**). La pérdida de agua durante el secado altera las interacciones que mantienen la estabilidad de la membrana y otras funciones celulares esenciales (**Hibshman et al., 2020**). El choque osmótico durante la congelación, pero también la desecación de las células puede promover la formación de ROS, los cuales pueden reaccionar con componentes celulares e iniciar reacciones dañinas basadas en la oxidación de lípidos o peroxidación de proteínas (**Rockinger et al., 2021**).

### 5.1.6. Daños ocasionados durante el almacenamiento

La estabilidad del ADN en muestras secas está determinada por el contenido de humedad residual de la muestra y la presencia o ausencia de lioprotectores, el agua residual acelera las reacciones de degradación. Los factores ambientales como la temperatura, la humedad relativa y los niveles de oxígeno también afectan a dicha estabilidad (**Zhang et al., 2017**). No se dispone de mucha información sobre datos de almacenamiento en seco de células eucariotas pero hay estudios que muestran capacidad de fertilidad en espermatozoides liofilizados de ratón tras ser almacenados a 4°C durante 3 años (**Kaneko y Serikawa, 2012**).



**Figura 5.** Tardigrado (**Hibshman et al., 2020**)

Si nos vamos a otro tipo de muestras, nos encontramos con el estudio de **Rebecchi et al. (2006)** donde se evaluaba la relación entre la capacidad de recuperación de la desecación y el tiempo de anhidrobiosis de tardígrados (**Figura 5**), así como la capacidad de supervivencia a largo plazo. En este estudio se almacenó liquen seco dentro de una bolsa de papel en el laboratorio a temperatura y humedad ambiente y bajo exposición al oxígeno atmosférico. Posteriormente, las réplicas de liquen

seco se rehidrataron después de varios períodos de almacenamiento. Después de aproximadamente 1 año el porcentaje de supervivencia fue del 74,9%, después de dos años de 44,8% y después de 3 años de 40,4%. Observaron una disminución significativa de la supervivencia con el paso del tiempo. Esto puede hacer pensar que la desecación o anhidrobiosis durante un periodo de tiempo corto no causa daños significativos en el ADN, lo que sugiere que los animales son capaces de proteger suficientemente el ADN durante las primeras fases de la desecación. Se sabe que el daño al ADN aumenta progresivamente con la duración y la temperatura de almacenamiento de las muestras desecadas, lo que sugiere un efecto genotóxico del almacenamiento (**Neumann et al., 2009**).

En un estudio de **Zhang et al. (2017)** se observó que durante el almacenamiento a temperatura ambiente la oxidación por radicales libres ha sido implicada como principal causa de la degradación del ADN durante el almacenamiento, independientemente de la presencia de un estado vítreo. La eliminación del agua que rodea a las biomoléculas puede provocar cambios estructurales irreversibles en la organización de las membranas celulares, así como en la agregación de proteínas. Se ha demostrado que los lípidos insaturados son especialmente sensibles al ataque de ROS que se han acumulado durante la liofilización. Los ROS pueden alterar directamente la estructura de la cromatina tras la rehidratación (**Neild et al., 2005**).

La liofilización induce daños en la membrana plasmática y en el ADN causados por radicales libres y alteraciones físicas, como la presión osmótica o la temperatura (**Gürler et al., 2016**). Ante la ausencia de estudios realizados sobre liofilización de ovocitos, se presenta la necesidad de extrapolar los resultados obtenidos en distintos estudios con los resultados sobre otro tipo celular, como son los espermatozoides, las células somáticas o linfocitos. En los últimos años ha habido un creciente interés en las nuevas técnicas de conservación para preservar al máximo la variabilidad genética de las especies.

Se plantea el uso de la liofilización de ovocitos para alcanzar este objetivo dado los resultados más que prometedores en otro tipo de células como en espermatozoides. Hoy en día, es necesario investigar sobre las posibles variables que podrían tener influencia sobre los resultados de la liofilización de ovocitos.

#### 5.1.7. Daños ocasionados durante la rehidratación

Hasta ahora, la mayoría de los estudios se centran en optimizar el proceso de secado para reducir el daño, y se sabe poco sobre las condiciones de rehidratación, paso crítico (**Loi et al., 2021**). Los datos disponibles de levaduras y bacterias liofilizadas muestran que la dinámica de la rehidratación afecta a la viabilidad celular en la misma medida que la congelación y el secado. La comprensión de los cambios

fisicoquímicos que se producen en las células liofilizadas durante la rehidratación es fundamental para mejorar la viabilidad (**Loi et al., 2013**).



**Figura 6.**

Rehidratación  
ovocitos  
liofilizados  
(**Flor, 2018**)

Durante la rehidratación (**Figura 6**) se produce una transición de fase liotrópica a medida que las membranas vuelven a un estadio líquido, es importante tener en cuenta que un flujo de agua más rápido de lo deseado también provoca una lisis de las membranas celulares (**Arav, 2020**). La desestabilización de la membrana y la pérdida de la homeostasis intracelular después de la rehidratación son consecuencias de una transición de la membrana de líquido a gel como consecuencia del proceso de secado (**Mazur, 2004**).

La mayoría de los estudios en este campo se han centrado en la congelación, medios de secado y proceso de secado. Normalmente la rehidratación se consigue simplemente añadiendo a la muestra el volumen de agua perdido. Este enfoque, sin embargo, podría ser problemático y perjudicial para las células puesto que la exposición repentina al agua pura puede provocar un rápido movimiento del agua hacia el interior de las células, causando una expansión más rápida de lo deseado y una posible ruptura de la membrana celular (**Saragusty y Loi, 2019**). En células hidratadas, el agua proporciona un disolvente polar en el que las moléculas con regiones hidrofílicas expuestas son estables. La pérdida de moléculas de agua como aislante entre fosfolípidos provoca la compresión de la membrana, lo que conduce a un aumento de la rigidez, la fragmentación y fugas. Para dar solución a esta problemática se planteó la hipótesis de que incorporando moléculas polares como glicerol o trehalosa, quizás las células fueran capaces de simular los tipos de interacciones moleculares de un medio acuoso. En condiciones de hidratación, el agua rodea los grupos de cabeza de los fosfolípidos, proporcionando espacio entre grupos polares (**Hibshman et al., 2020**).

## 5.2. Variables que tienen influencia sobre los resultados de la liofilización

En la actualidad, la crioconservación mediante congelación se considera el método de referencia para el almacenamiento de células vivas, sin embargo, las muestras liofilizadas podrían permitir una mayor estabilidad a temperaturas más elevadas, bien de refrigeración o incluso temperatura ambiente y facilitar por tanto su transporte y almacenamiento. En el caso de los ovocitos diversos estudios han investigado sobre diferentes factores que podrían tener alguna influencia sobre el éxito de esta técnica, entre ellos encontramos los lioprotectores usados en el proceso, la incorporación de agentes quelantes, el grado de maduración de ovocitos a liofilizar, la presencia de células del cúmulo o no en

los mismos, las condiciones de liofilización, la adición de antioxidantes en determinados momentos del proceso o la temperatura de almacenamiento de las muestras liofilizadas.

Para evitar los procesos dañinos y estabilizar las células y las proteínas durante el procesado, ha surgido una amplia gama de excipientes protectores que se clasifican en lioprotectores y crioprotectores (CPA) (**Rockinger et al., 2021**). Los lioprotectores son moléculas que proporcionan más estabilidad durante la congelación y desecación, mientras que los crioprotectores mejoran la estabilidad durante la congelación y proporcionan poca estabilidad durante el secado. Al utilizar excipientes estabilizantes, debe tenerse en cuenta su toxicidad (**Best, 2015**).

La concentración de los CPA es un factor crucial ya que debe ser lo suficientemente alta como para garantizar la estabilidad, pero también se correlaciona con una mayor toxicidad. Durante la congelación la formación de cristales extracelulares y la sobre concentración de los excipientes aplicados puede dar lugar a concentraciones aún más elevadas e incluso tóxicas (**Satpathy et al., 2004**). Con el fin de superar estas desventajas, **Qiu et al. (2023)** desarrollaron una vitrificación adaptada, tratando de reducir la concentración de crioprotectores, utilizando una solución crioprotectora, EDFS 10/10: 10% de etilenglicol, 10% de Me SO, 0,4M de sacarosa y 24% de Ficoll PM70, para vitrificar embriones de ratón en diversas etapas y ovocitos maduros en un entorno cercano al equilibrio. Las tasas de supervivencia en el caso de los ovocitos fueron muy altas (88-99%). Se puede concluir, por lo tanto, que la vitrificación en condiciones próximas al equilibrio utilizando bajas concentraciones de crioprotectores también es factible para los ovocitos de todo tipo de especies, sin efectos adversos sobre las tasas de fertilización o de desarrollo. Se piensa que esta técnica es beneficiosa para los ovocitos ya que son más sensibles a la toxicidad de los crioprotectores.

### **5.2.1. LIOPROTECTORES**

Para explorar estrategias de conservación alternativas, los científicos se han inspirado en una gran variedad de organismos como hongos, plantas o animales que han evolucionado para sobrevivir a una deshidratación casi completa en la naturaleza, estos organismos se denominan anhidrobióticos (**Comizzoli et al., 2022**). Los organismos anhidrobióticos, como los tardígrados y los mosquitos, entre otros, son capaces de soportar la privación de agua. Una vez que detectan una reducción en el agua ambiental, activan una expresión génica oportuna y regulada que conduce a la acumulación de xeroprotectores (**Miyata et al., 2019**). Lo que se llama colectivamente xeroprotectores son el conjunto de agentes protectores que se acumulan dentro y alrededor de las células. Estos componentes van desde azúcares y osmolitos hasta una familia compleja de proteínas. Desafortunadamente, ninguno de los genes que codifican estos compuestos está presente en el genoma de vertebrados, por lo tanto, la

única forma de proteger las células contra la deshidratación es proporcionarles xeroprotectores adecuados antes de eliminar su contenido en agua para conseguir su protección (**Loi et al., 2021**).

Es probable que los lioprotectores expresados en organismos anhidrobióticos, o posiblemente sus análogos sintéticos mejorados, desempeñen un papel importante en el desarrollo futuro del procesamiento en seco. Recientemente, se están identificando nuevas moléculas claves responsables de la tolerancia a la desecación de organismos anhidrobióticos tales como proteínas termoestables: cytosolic abundant heat soluble (CAHS), mitochondrial abundant heat soluble (MAHS), o secretory abundant heat soluble (SAHS) (**Yamada et al., 2020**). Por lo tanto, el número de xeroprotectores que se probarán para el secado reversible en células de mamíferos se está expandiendo y los nuevos candidatos prometen mejorar el estado actual de la técnica (**Loi et al., 2021**).

La liofilización es uno de los métodos más utilizados para la conservación en seco de material biológico, sin embargo, la liofilización de células es poco frecuente debido a las dificultades para introducir lioprotectores en éstas. Las células que son intrínsecamente más resistentes al estrés por desecación serían las bacterias y las levaduras, que son capaces de sintetizar lioprotectores y por lo tanto pueden ser liofilizadas con más facilidad. Como xeroprotectores pueden utilizarse diferentes moléculas, como por ejemplo los azúcares, principalmente disacáridos como trehalosa, sacarosa o sucralosa, una amplia gama de proteínas como las LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins), proteínas de choque térmico (HSP) y otros compuestos como, antioxidantes, lípidos, hidroxietil almidón, polisacáridos extracelulares, prolina. La acumulación de estos xeroprotectores es lenta, gradual, y tiene lugar en paralelo al proceso de secado (**Saragusty y Loi, 2019**).

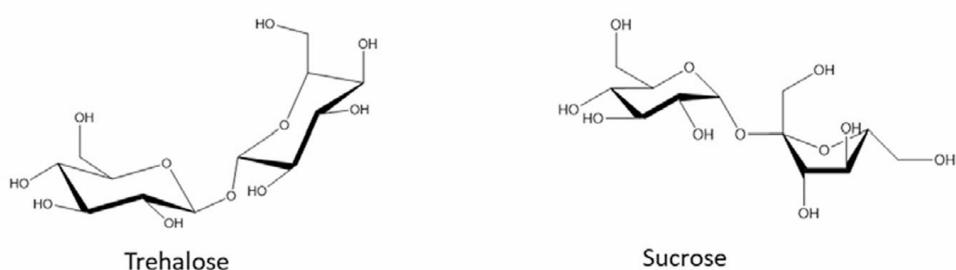
**Tabla 1.** Lioprotectores y su acción (**Loi et al., 2013**).

Compuesto	Acción
Azúcares (trehalosa, sacarosa, sucralosa)	Sustitución del agua y formación de una matriz vítreo, inhibe la fusión entre las membranas
Proteínas LEA	Estabilizan la estructura celular reduciendo la agregación entre proteínas desnaturalizadas
Proteínas HSP	Evitan la agregación proteica
Polisacáridos extracelulares	Mantienen la integridad celular reteniendo agua alrededor de las células
Lípidos	Estabilizan proteínas y membranas
Hidroxietil almidón (HES)	Inhiben la fusión entre membranas
Prolina	Estabiliza las membranas y reduce el estrés oxidativo

### 5.2.1.1. Azúcares

La liofilización requiere el uso de protectores específicos para estabilizar las biomoléculas durante el procesado. Algunos ejemplos son los disacáridos no reductores como la sacarosa y la trehalosa. Estos azúcares tienen buenas propiedades de transición vítrea y pueden sustituir los enlaces de hidrógeno del agua con las biomoléculas durante la deshidratación (Zhang et al., 2017). La transición vítrea o vitrificación, es el proceso en el que el fluido prácticamente se solidifica sin formar cristales. Es producida por la disminución de la movilidad molecular causada por el descenso en la temperatura; el soluto no se congela al llegar a la temperatura eutéctica y al seguir enfriando el sistema, la solución se transforma en un sólido amorfó vidrio (Alzate y Eduardo, 2008). Durante el almacenamiento en seco, la solución en la que se liofilizan las células debe tener una alta temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) para proteger las células durante largos períodos de tiempo (Arav, 2020). Efectivamente, los azúcares tienen una alta  $T_g$  y en general, aumenta con el peso molecular.

En presencia de azúcares como la sacarosa, la temperatura de transición vítrea aumenta considerablemente a temperaturas por encima de 0°C. Otra función sugerida para los azúcares es la posición de una molécula de agua en la cabeza polar de las membranas, así como en las estructuras proteicas, lo cual aumenta su estabilidad. Estos azúcares también forman estabilidad estructural al formar un gran número de enlaces de hidrógeno con membranas y proteínas al sustituir a las moléculas de agua durante el proceso de secado (Figura 7). El inconveniente de estos azúcares, desde un punto de vista de la conservación, es que no penetran fácilmente en las células (Saragusty y Loi, 2019).



**Figura 7.** Estructura química de la trehalosa y sacarosa (Rockinger et al., 2021).

Además de ralentizar el metabolismo y producir componentes críticos, una de las claves para alcanzar y sobrevivir en condiciones de sequedad depende de la capacidad de los organismos para sintetizar y acumular disacáridos intracelulares mientras pierden contenido de agua (Wolkers y Oldenhof, 2020). Como muchos excipientes no pueden atravesar fácilmente la membrana celular, los investigadores han establecido diversas técnicas para introducir especialmente trehalosa intracelularmente antes del secado (Rockinger et al., 2021).

La trehalosa fue el primer lioprotector y su eficacia fue demostrada por **Wolkers et al. (2001)** en un estudio de secado de plaquetas. Es un disacárido no reductor de la glucosa que se encuentra en altas concentraciones en muchos organismos invertebrados anhidrobióticos y ha demostrado estabilizar las estructuras biológicas. **Men et al. (2013)** demostraron que el medio de liofilización suplementado con trehalosa es capaz de reducir el grado de daño en el ADN que se produce durante la liofilización tanto en las células somáticas como en los espermatozoides. Se ha utilizado como crioprotector para la congelación de ovocitos, aunque en el momento del secado es cuando resulta más útil (**Eroglu, 2010**).

En un estudio de **Dang-Nguyen et al. (2018)**, sobre la capacidad de maduración tras la transferencia de VG liofilizadas de ovocitos porcinos sobre ovocitos enucleados se obtuvo una proporción de VG con ADN y membrana intacta liofilizado en medio suplementado con trehalosa significativamente superiores a las del control sin dicha suplementación. Por lo tanto, la suplementación con trehalosa entre 100 y 200 mmol/L en medio de liofilización aumentó significativamente la tasa de supervivencia tras la transferencia de VG. Tras su introducción en las células, las principales ventajas de la trehalosa son su baja toxicidad y su alta temperatura de transición vítrea en comparación con los crioprotectores convencionales como el dimetilsulfóxido (**Comizzoli et al., 2022**).

El efecto beneficioso de la trehalosa en el medio de secado ha quedado patente desde el primer estudio sobre la liofilización de células somáticas (**Loi et al., 2008**) y ha sido confirmado en los últimos años por **Zhang et al. (2017)**, que demostraron que la trehalosa como agente protector reduce el daño del ADN durante el almacenamiento a una temperatura igual o inferior a 4°C.

**Hibshman et al. (2020)** propone tres mecanismos para explicar las propiedades de tolerancia a la desecación de la trehalosa:

- En primer lugar, la trehalosa amortigua las membranas ante los efectos adversos de la pérdida de agua, reemplazando al agua y creando así un espacio adecuado entre los fosfolípidos y permitiendo la retención de la fluidez de la membrana. A medida que las células se deshidratan se sustituyen las moléculas de agua para formar enlaces de hidrógeno con las biomacromoléculas naturales como pueden ser membranas lipídicas, proteínas o ácidos nucleicos. La función de la trehalosa como “sustituto del agua” se conoce como la hipótesis de reemplazo de agua y este mecanismo se solapa probablemente con su función en la formación de vidrios biológicos (**Crowe, 2007**).
- La segunda hipótesis afirma que una capa extremadamente fina de agua que rodea las superficies de las macromoléculas permanece atrapada en una cáscara formada por trehalosa para preservar sus estructuras nativas ordenadas durante la desecación, protegiendo a las proteínas de daños.

- Por último, la eliminación del agua provoca un aumento de la viscosidad de la trehalosa y la transforma del estado líquido a un estado vítreo. Aunque la propiedad de transición vítrea no es exclusiva de la trehalosa, esta tiene una temperatura de transición vítrea muy alta (115°C), casi 60°C superior a la sacarosa que tiene el mismo peso molecular, lo que proporciona estabilidad a temperaturas relativamente altas. La trehalosa también es única por el hecho de que no pierde completamente su estado vítreo, aunque se rehidrate ligeramente (**Saragusty y Loi, 2019**).

Con todo esto se puede considerar que la cierta degradación del ADN resultante de la liofilización se reduce en presencia de trehalosa. La mejora en la supervivencia celular que se produce durante la congelación en presencia de trehalosa se debe a su entrada en las mismas gracias a las imperfecciones que se producen en la membrana. Sin embargo, durante el almacenamiento a temperatura ambiente la trehalosa puede prevenir el daño al ADN, pero únicamente en menor medida ya que este mecanismo se ve dificultado, de hecho, se ha confirmado que el daño siempre será menor que en ausencia de trehalosa (**Zhang et al., 2017**). La trehalosa por sí sola no permite que las células somáticas o los ovocitos se sometan a una liofilización seguida de una rehidratación y permanezcan viables; por lo tanto, se necesitan otros lioprotectores para cumplir con la tarea (**Loi et al., 2008**).

### 5.2.1.2. Proteínas

En muchos casos, la expresión heteróloga de proteínas demuestra la posible actividad de los protectores para la supervivencia a la desecación. Sin embargo, las funciones endógenas de las proteínas suelen estar mal caracterizadas. La realización de más experimentos *in vivo* y sacar conclusiones sobre los protectores en su contexto original ayudará a distinguir entre los posibles protectores los que son esenciales. Varios temas comunes de tolerancia a la desecación han surgido de la investigación en artemia, nematodos y tardígrados. Por ejemplo, cada uno de estos tres animales tiene genes que codifican proteínas LEA, proteínas de choque térmico como Hsp70 y pequeñas proteínas de choque térmico. Otros mecanismos son más importantes en algunos animales que en otros (**Hibshman et al., 2020**).

### MACROMOLÉCULAS

Las macromoléculas como la albúmina y el hidroxietil almidón (HES) pueden añadirse a las mezclas liofilizadas para aumentar la Tg. El agua actúa como plastificante y disminuye la temperatura de transición vítrea de las muestras liofilizadas. Por lo tanto, la estabilidad de almacenamiento depende del contenido de humedad residual tras la liofilización (**Shinyashiki et al., 2009**).

Una de las ventajas de utilizar albúmina es que la célula liofilizada tiene mejor aspecto, es más estable y es más fácil de disolver en agua en comparación con el uso de trehalosa a la hora de preparar los medios de liofilización. La trehalosa reduce el daño del ADN durante el almacenamiento mientras que la adición de albúmina no parece tener un efecto protector adicional. Aunque la albúmina aumenta la Tg, en el estudio de **Zhang et al. (2017)** no pareció tener un efecto positivo sobre la estabilidad del almacenamiento del ADN. Probablemente puede atribuirse a una falta de albúmina intracelular, lo que significa que la Tg intracelular no aumenta en presencia de albúmina.

#### PROTEÍNAS LEA

La síntesis de proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP) es un mecanismo común que contribuye a la anhidrobiosis en diversos organismos (**Hibshman et al., 2020**). Algunos ejemplos destacados de IDP son la familia de las proteínas LEA y las HSP. Las proteínas LEA se descubrieron por primera vez en semillas de algodón y más tarde en tejidos vegetativos de varias plantas (**Loi et al., 2021**). Existen siete clases de proteínas LEA que se han identificado en las plantas, pero la mayoría de los animales solo tienen proteínas LEA del grupo 3 (**Battaglia et al., 2008**).

Las proteínas LEA no solo se expresan en plantas sino también en otros organismos como *Drosophila melanogaster* y sorprendentemente en eucariotas, lo que sugiere que las células de mamíferos pueden estar protegidas por los mismos mecanismos, aunque el camino hacia la liofilización de organismos más grandes no es tan sencillo. La acción protectora de las proteínas LEA es variable dependiendo de la unión a la membrana, la protección del ADN y la quelación iónica. Finalmente se ha descrito un efecto sinérgico entre la trehalosa y las proteínas LEA (**Hand et al., 2011**). La expresión heteróloga de un cóctel de proteínas LEA que protegen de forma específica el ADN, las membranas y los orgánulos celulares parece ser el mejor protocolo para la inducción de la desecación reversible en células de mamíferos (**Loi et al., 2021**). Diversos estudios han considerado que las proteínas LEA confieren tolerancia a la desecación en células somáticas, concluyendo que las proteínas por sí solas, pero preferiblemente en asociación con un azúcar pueden contribuir al éxito de un medio de liofilización (**Loi et al., 2013**).

La identificación de “reguladores maestros” de los protectores requeridos para la tolerancia a la desecación sugiere que la respuesta a la desecación también está sujeta a un control coordinado y podría informar la nueva búsqueda de protectores adicionales también controlados por reguladores (**Hibshman et al., 2020**).

## PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las HSP han sido denominadas retenedoras por su actividad para rodear las proteínas mal plegadas y evitar su agregación hasta que una proteína de choque térmico accionada por ATP, como la Hsp70, pueda unirse a la proteína y volver a plegarla de forma correcta (**Willsie y Clegg, 2002**). Las proteínas de choque térmico Hsp70s son una familia de chaperonas dependientes de ATP esenciales para el plegamiento de proteínas. Se piensa que p26 previene el mal plegamiento y la agregación de proteínas durante la desecación, mientras que Hsp70 permite volver a plegar las proteínas durante las primeras etapas de recuperación (**Hibshman et al., 2020**).

El transcriptoma reveló que varios sistemas de reparación del ADN, como la recombinación homóloga o la reparación por escisión de nucleótidos están activos durante la fase de rehidratación en una línea celular anhidrobiótica. Ciertas HSP también son reguladas por procesos de rehidratación en pupas de moscas, lo que sugiere funciones distintas (**Comizzoli et al., 2022**).

### 5.2.1.3. Glicerol

La primera criopreservación exitosa de espermatozoides se logró gracias a la asociación de sacarosa y glicerol (**Polge et al., 1949**). El descubrimiento accidental de la acción protectora del glicerol como crioprotector más potente aseguró el éxito de la ultracongelación de gametos y células en NL<sub>2</sub> (**Tilden, 2009**).

En **1964**, **Clegg** descubrió los efectos demostrados en la tolerancia a la congelación del glicerol. Se sabe que el glicerol tiene efectos probados en la tolerancia a la congelación, pero en el estudio de **Hibshman et al.** en **2020** aún no estaba claro hasta qué punto el glicerol podría ser un mecanismo de osmorregulación y supervivencia a la desecación o un almacén de energía durante la recuperación. Un poco más tarde, en **2021**, **Loi et al.** afirman que el glicerol permanece líquido y, lo que es más importante, resulta muy tóxico a temperatura ambiente, por lo que no resultaría adecuado para su uso en almacenamiento en seco. Finalmente, el proceso de liofilización representa un gran estrés mecánico y osmótico, especialmente porque no se pueden añadir crioprotectores como el glicerol, antes de la congelación debido a su aspecto líquido y su gran toxicidad en el almacenamiento a temperatura ambiente.

#### 5.2.1.4. Lípidos

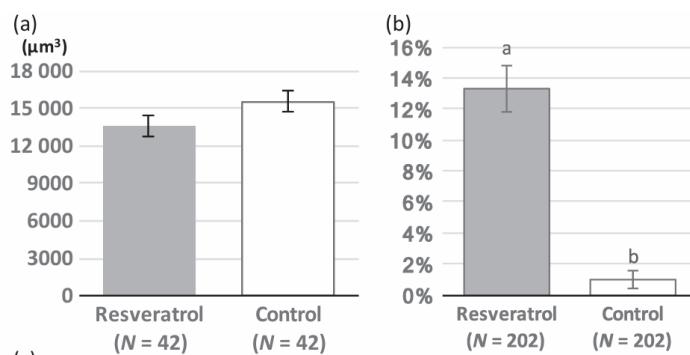
Varios genes implicados en la desaturación de ácidos grasos son necesarios para la tolerancia total a la desecación. Cabe destacar que el ácido araquidónico puede desempeñar un papel particular en la resistencia a la desecación (**Erkut et al., 2013**). Es posible que la descomposición de los ácidos grasos pueda proporcionar una reserva de energía durante un momento de actividad limitada de la fosforilación oxidativa. También es posible que los ácidos grasos en las bicapas lipídicas puedan contribuir a la fluidez de la membrana. Una tercera posibilidad es que varias especies de lípidos pueden sufrir peroxidación, funcionando como suministro de ROS durante la desecación (**Hibshman et al., 2020**).

Los cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana de los ovocitos afectan a los parámetros biofísicos y afectan a la sensibilidad al frío de las células. En el estudio de **Saragusty y Arav, (2011)**, la diferencia en la capacidad de conservación entre ovocitos y embriones vitrificados se atribuyó principalmente a las diferencias en la composición lipídica de las membranas, con menos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los ovocitos en comparación con los embriones.

#### 5.2.1.5. Resveratrol

Generalmente, el ADN empaquetado en cromatina es más estable que el ADN desnudo y el ADN purificado es más estable que el ADN en células o tejidos debido a la presencia de compuestos oxidantes (**Zhang et al., 2017**). El resveratrol es un potenciador de la histona deacetilasa que produce un “estado cerrado” de cromatina. **Dang-Nguyen (2018)** valoró la influencia del resveratrol sobre la liofilización de VG. Se recolectaron complejos cúmulus-ovocito que se maduraron *in vitro* en un medio suplementado con 1mmol/L de resveratrol, con el objetivo de inducir la compactación de VG antes de la liofilización. A continuación se extrajeron las células del cúmulo mediante un pipeteo suave, los ovocitos se centrifugan y se aislan VG que posteriormente se transfirieron a la zona pelúcida. Se procede a la liofilización de VG que posteriormente se almacenan en diferentes condiciones. Las VG liofilizadas se rehidrataron y se mantuvieron en un medio suplementado con un 10% de serum fetal bovino hasta que se utilizaron para transferirlos a VG frescos enucleados. Para examinar si el tratamiento con resveratrol mejora la tasa de supervivencia, tanto los ovocitos tratados con resveratrol como los no tratados (grupo control) se sometieron a la transferencia de VG. Se examinó la tasa de supervivencia de los ovocitos reconstruidos 1 hora después de la inyección de VG liofilizadas en el citoplasma de un ovocito fresco enucleado. Los resultados no mostraron una reducción significativa del tamaño de las VG, pero hubo una notable mejora en la tasa de supervivencia tras la transferencia de VG (**Figura 8**). Si bien podríamos obtener una tasa de supervivencia de casi 100% para

pasos de enucleación, inyectando VG liofilizadas directamente en los citoplasmas resultó en una inmensa muerte celular debido a su gran volumen.



**Figura 8.** Efecto de resveratrol en la compactación de VG (a), y tasa de supervivencia después de la transferencia de VG (b) (Dang-Nguyen et al., 2018).

### 5.2.2. AGENTES QUELANTES

El EDTA es el nombre abreviado para el ácido etilendiaminina tetraacético mientras que EGTA es el término abreviado para el ácido etilenglicol tetraacético, ambos son agentes quelantes y tienen más o menos las mismas propiedades (Hasan et al., 2019). En el estudio de Said et al. (2020) sobre espermatozoides bovinos, se concluyó que la adición de aminoácidos (glicina, cisteína) o una combinación con EDTA en el medio de liofilización reducía la morfometría de las cabezas espermáticas y los daños en la membrana plasmática de los espermatozoides, sin embargo, la integridad del ADN de los espermatozoides permanecía intacta tras la liofilización, incluso sin la adición de aminoácidos y EDTA. Parece que la adición de agente quelante, como EDTA o EGTA a la solución de liofilización inactiva la DNasea espermática y protege contra la alteración del ADN espermático durante la liofilización y el posterior almacenamiento (Kaneko y Nakagata, 2006).

Los quelantes permiten utilizar iones metálicos libres reduciendo así la formación de radicales hidroxilo. La desferrioxamina, que es un quelante de metales, en sus orígenes se utilizaba para tratar el envenenamiento por hierro. El EGTA es estructuralmente similar al EDTA, pero tiene menos toxicidad y mayor afinidad por los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Los agentes quelantes parecen ser una clase importante de excipientes para liofilización de espermatozoides, sin embargo, aún no se ha publicado ningún experimento sobre su efecto en otros tipos de células (Rockinger et al., 2021).

### 5.2.3. ANTIOXIDANTES

También se puede utilizar una amplia gama de pequeñas moléculas, como los antioxidantes, en concentraciones bajas para disminuir los efectos perjudiciales del estrés oxidativo producido por la formación de ROS (**Said et al., 2019**). Varios estudios han demostrado el efecto beneficioso sobre el estrés oxidativo de la terapia antioxidant en la crioconservación sobre todo de células reproductoras como por ejemplo en espermatozoides de mamíferos (**Motlagh et al., 2014**). Solo unos pocos antioxidantes se han introducido con éxito como protectores durante el secado como son la arbutina, el epigalocatequingalato y el ácido rosmarínico y sus rendimientos no puede explicarse únicamente por la inhibición de la formación de ROS (**Rockinger et al., 2021**).

#### 5.2.3.1. Arbutina

La arbutina se encontró en altas concentraciones en las hojas secas de *Myrothamnus flabellifolia*. Se piensa que sus fuertes propiedades antioxidantes y su capacidad para inhibir la formación de ROS podrían haber contribuido en el aumento de la viabilidad de células madre mesenquimales durante el secado. Además, induce la expresión de una proteína de choque térmico que funciona como estabilizadora de proteínas, inhibiendo la apoptosis. Curiosamente, el efecto de la arbutina no fue universalmente aplicable a todos los tipos celulares y se registraron efectos tóxicos para células B murinos (**Jamil et al., 2005**).

#### 5.2.3.2. Epigalocatequingalato (EGCG)

Otro excipiente de origen vegetal utilizado como antioxidante es el Epigalocatequingalato, un polifenol que se encuentra de forma natural en el té verde, tiene efectos antioxidantes, antibacterianos, anticancerígenos y antivirales. En el caso de EGCG, los efectos protectores y tóxicos están estrechamente relacionados ya que se basan en el mismo mecanismo, por lo que se sugiere la eliminación del exceso de EGCG después de la reconstitución. El EGCG estabiliza las células durante el secado mediante interacciones de grupos polares de las membranas celulares (**Natan et al., 2009**).

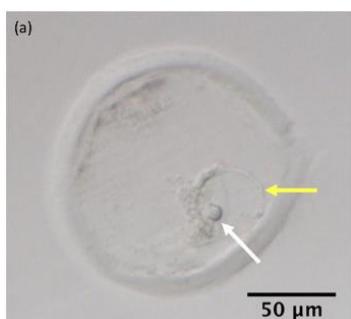
#### 5.2.3.3. Ácido rosmarínico

En un estudio sobre preservación espermática desarrollado en **2014** por **Luño et al.** se observó que la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides congelados y posteriormente descongelados mejoró con la suplementación de ácido rosmarínico (AR), además, la motilidad total y progresiva fue significativamente mayor en los diluyentes con dicha suplementación. Los resultados sugieren que el AR protege a los espermatozoides de verraco contra el estrés oxidativo durante la crioconservación gracias a sus propiedades antioxidantes. Más tarde, en **2017**, **Olaciregui** valoró varias

sustancias añadidas al diluyente de liofilización para minimizar el daño en el ADN, incluido el AR. Independientemente del tipo de agente quelante usado, EGTA o EDTA, las muestras liofilizadas en medio suplementado con AR mostraron un porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN significativamente menor (9,8%) frente a las muestras del grupo control sin dicha suplementación (14.2%).

En base a estos resultados, en **2018 Flor** optó por incorporar AR para la rehidratación de las muestras de ovocitos liofilizados adicionado AR al agua estéril utilizada para tal fin. Sin embargo, la tasa de recuperación posterior a la rehidratación fue bastante baja (21%) en comparación con el 88% de tasa de recuperación obtenido por **Patrizio, Loi y Arav** en **2012**. Seguramente porque es indispensable la denudación previa a la rehidratación de los ovocitos, antes de llevar a cabo su valoración para poder determinar su estadio nuclear, lo cual no se realizó en este estudio.

#### 5.2.4. GRADO DE MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS A LIOFILIZAR



**Figura 9.** Vesícula germinal (VG) con envoltura nuclear intacta tras la rehidratación del ovocito liofilizado. (**Dang-Nguyen et al., 2018**)

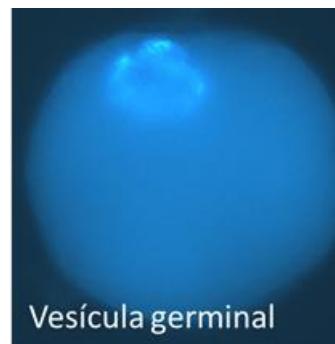
Los ovocitos en estadio de VG, metafase I (M-I) y metafase II (M-II) parecen ser los mejores candidatos a la liofilización ya que son los que mantienen aparentemente la integridad nuclear tras el proceso de liofilización. Según el estudio de **Dang-Nguyen et al. (2018)** los ovocitos en M-II son los preferibles para ser sometidos a liofilización, debido al tamaño relativamente menor del material nuclear en comparación con de ovocitos en VG. En la **Figura 9** podemos observar señalado por la flecha blanca el nucleolo y por la flecha amarilla la VG. Es interesante tener un pequeño tamaño de material nuclear, puesto que será el material que se va a transferir a ovocitos frescos enucleados para que prosigan su desarrollo una vez que hayan sido activados.

Si se transfiere material cromosómico de mayor tamaño, como lo es la VG, en los citoplasmas de dichos ovocitos enucleados, cabe esperar una menor tasa de supervivencia. Sin embargo, la gran mayoría de los ovocitos liofilizados en estadio M-II mostraron graves alteraciones cromosómicas y de ADN. En el caso de los ovocitos liofilizados en estadio de VG, aunque se produjeron daños en el ADN en más de la mitad de las VG, la otra mitad tenían envoltura y estructura de ADN intactas.

Además, **Dang-Nguyen et al. (2018)** demostraron por primera vez que se pueden producir ovocitos maduros derivados a partir de ovocitos liofilizados. Su estudio consistió en la inyección de VG recuperadas de ovocitos inmaduros liofilizados en el citoplasma de ovocitos frescos enucleados y

posterior maduración *in vitro* (MIV) de los mismos. Esta técnica es la única forma de solucionar el problema relacionado con el daño de la membrana celular y las estructuras del ADN durante la exposición de las células al procedimiento de liofilización hasta ahora. Los ovocitos reconstruidos, producidos mediante transferencia de ADN intacto a ovocitos enucleados sanos, tienen la capacidad para madurar. La mayoría de los ovocitos reconstruidos presentaban anomalías cromosómicas, pero 3 de los 126 ovocitos reconstruidos pudieron alcanzar el estadio de M-II. Aunque se trata de una tasa de maduración muy modesta, es uno de los logros para desarrollar y optimizar la técnica de liofilización de ovocitos.

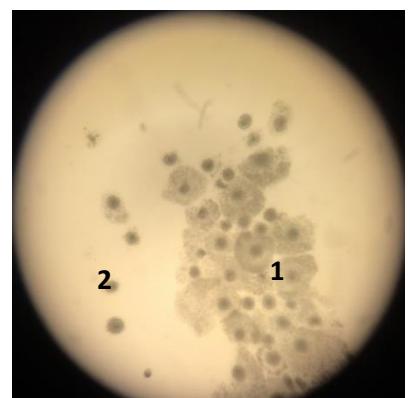
En el estudio de **Flor (2018)**, se observó que el 100% de los ovocitos en M-I y en M-II, así como el 86,7% de los ovocitos en VG (**Figura 10**) presentaban el núcleo aparentemente íntegro tras la liofilización, mientras que el resto de ovocitos presentaban núcleos aparentemente no íntegros o bien al tratarse de ovocitos con células del cúmulo no podían ser valorados. Además, los ovocitos maduros mostraron mayor porcentaje de formas anormales (66,7% frente a 41,5%) y normales (31,4% frente a 12,2%) en comparación con los inmaduros, principalmente porque tienen un elevado porcentaje de ovocitos no valorable (46,3%), lo cual dificultó conocer los porcentajes reales. A pesar de que todos los ovocitos rehidratados presentaban un tamaño normal, el 66,7% de ovocitos maduros y el 41,5% de los inmaduros presentaron alteraciones en su forma, lo que indicaría que los ovocitos maduros afrontan mejor el proceso de liofilización en este sentido, coincidiendo con los resultados de **Dang-Nguyen et al.** ese mismo año.



**Figura 10.** VG de un ovocito liofilizado y posteriormente rehidratado (**Flor, 2018**)

### 5.2.5. INFLUENCIA DE CÉLULAS DEL CÚMULUS *OOPHORUS*

En relación a la influencia de las células del cúmulo sobre la liofilización (**Figura 11**), **Flor (2018)** observó que el grupo de ovocitos liofilizados con presencia de células del cúmulo en menor o mayor cantidad, ofrecía un aspecto morfológico anormal o incluso no valorable, por lo que la presencia de células del cúmulo en el ovocito parece tener una influencia negativa sobre la liofilización. Además, el porcentaje de núcleo aparentemente íntegro fue del 55,7% en los ovocitos sin cúmulo, del 66,7% en los ovocitos con cúmulo parcialmente presente y del 66,7% en los ovocitos con cúmulo desprendido. Por lo tanto, se piensa que la presencia de células del cúmulo durante la liofilización no tiene ninguna influencia en el mantenimiento de la integridad del núcleo del ovocito,



**Figura 11.** ovocitos con (1) y sin (2) cúmulus *oophorus*.

pero si tiene influencia negativa en la morfología del ovocito. El porcentaje de ovocitos no valorables se encontró muy elevado entre los inmaduros debido a la presencia de muchas células del cúmulo cubriendolos, ya que estos no fueron denudados antes de vitrificar y estas células dificultaban la valoración.

### **5.2.6. CONDICIONES DE LIOFILIZACIÓN**

Según **Men et al. (2013)**, los mejores resultados para la liofilización de esperma se obtuvieron con las condiciones en las que el secado primario duró 19 horas a 0,13 hPa y el secado secundario duró 3 horas a 0,13 hPa. Además, se sabe que con materiales amorfos debe tenerse cuidado de no superar su temperatura de transición vítrea. Como este valor crece a medida que la muestra se seca es recomendable hacer de forma gradual el incremento de temperatura del liofilizador y, consecuentemente del material liofilizado (**Alzate y Eduardo, 2008**), posiblemente este hecho deba de tenerse en cuenta en el procesado ovocitario.

Sin embargo, todavía no se conoce a ciencia exacta la mejor estrategia de secado a aplicar para optimizar los resultados, ya que cambia mucho en función de la especie y del tipo de muestra. En cuanto a la rehidratación, hasta ahora el volumen de agua sustraído se agregaba en un solo paso, provocando una exposición repentina al agua pura, lo cual probablemente causa daños osmóticos y mecánicos (**Saragusty y Loi, 2019**). Para evitar este problema **Loi et al. (2021)** recomiendan un proceso de rehidratación lenta y progresiva, por ejemplo, colocando las muestras para la etapa inicial de rehidratación en una cámara de humedad o similar. Una rehidratación más gradual puede mejorar aún más los resultados, y por lo tanto, reside en un campo a explorar.

En próximos estudios será necesario investigar la combinación de deshidratación y rehidratación para hallar la mejor manera de secado. Para lograr un secado reversible alcanzando un estatus similar al de la criopreservación, es crucial que los procesos de secado y rehidratación imiten lo máximo posible los procesos que ocurren en la naturaleza (**Saragusty y Loi, 2019**). Aún no se ha establecido un método ideal para secar espermatozoides y células y existe la necesidad de explorar exhaustivamente otras estrategias de desecación distintas de la liofilización, como por ejemplo, el secado al aire, el secado por centrifugación o el secado por pulverización distintos de las estrategias de secado alimentario y farmacéutico, adaptadas a las necesidades específicas de las células. Diseñar prototipos fiables de dispositivos de secado teniendo en cuenta las necesidades específicas de las células y gametos podría ser una solución considerable.

### 5.2.7. TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

Una vez las muestras liofilizadas, no está claro cuál es la T<sup>a</sup> de almacenamiento más adecuada para la conservación de las mismas, si de refrigeración a 4 °C o a T<sup>a</sup> ambiente. En cualquiera de los dos casos, siempre será más sencillo que en NL<sub>2</sub>. En un estudio de **Olaciregui y Gil (2016)** se valoraron los efectos de diferentes factores sobre la integridad del ADN de espermatozoides. Se obtuvieron los siguientes resultados: los espermatozoides liofilizados y almacenados a T<sup>a</sup> ambiente mostraron un 10.6% de fragmentación de ADN, mientras que los almacenados a 4°C mostraron un 13.4%, dato ligeramente superior significativamente. Por otro lado, pudieron observar que cuanto más tiempo de almacenamiento transcurría, el % de fragmentación del ADN espermático se veía incrementado. **Zhang et al. (2017)** también coinciden en que la acumulación de daños en el ADN en células liofilizadas aumenta progresivamente durante el almacenamiento a T<sup>a</sup> ambiente, sin embargo, ellos plantean que podría paliarse con el almacenamiento a 4°C.

En el estudio de **Dang-Nguyen et al. (2018)** se comprobó la integridad del ADN de ovocitos inmaduros liofilizados y mantenidos posteriormente a -20°C, 4°C o T<sup>a</sup> ambiente. Las VG con membrana nuclear íntegra de observaron de forma significativamente superior en las muestras mantenidas a -20°C durante 5 días frente a las conservadas a 4°C y a temperatura ambiente. Por lo tanto, los resultados mostraron que el almacenamiento a -20°C ayuda a proteger la integridad de la envoltura nuclear y la integridad del ADN de las VG liofilizadas. Sin embargo, aunque el almacenamiento de VG liofilizadas a -20°C durante un corto periodo de tiempo minimiza los daños, a largo plazo, confirmaron que mantener las muestras a 4°C no aumentaba significativamente el daño al ADN, por lo que sería una buena opción.

**Kazorgah et al. (2024)** coinciden también en el hecho de que la T<sup>a</sup> y tiempo de almacenamiento de las muestras liofilizadas tiene influencia sobre los resultados de fragmentación del ADN tras la rehidratación. Ellos observaron que en los grupos de espermatozoides humanos liofilizados y almacenados a una temperatura de 4°C, no hubo diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los grupos conservados durante 1 o 2 meses. Sin embargo, en los grupos liofilizados y almacenados a temperatura ambiente, se observó una diferencia significativa entre grupos conservados durante 1 o 2 meses. El índice de fragmentación del ADN fue significativamente mayor en el grupo de espermatozoides liofilizados conservados durante 2 meses a temperatura ambiente.

En consecuencia, es necesario realizar más investigaciones para identificar métodos para mejorar la calidad espermática en el proceso de liofilización (**Kazorgah et al., 2024**).

## 6. CONCLUSIONES

Tras la realización de esta revisión bibliográfica sobre la liofilización de ovocitos en mamíferos, se han extraído varias conclusiones:

1. El gran tamaño de los ovocitos acentúa el problema de la penetración de lioprotectores en su interior de forma correcta, lo que complica su protección durante la liofilización y compromete los resultados de la misma.
2. Factores que afectan a la liofilización ovocitaria y sus resultados:
  - **Lioprotectores:** No hay un único lioprotector que asegura la supervivencia y éxito tras la rehidratación, la combinación adecuada de varios dará la clave del éxito.
  - Los **medios de liofilización** deben contar con una alta temperatura de transición vítrea para proteger las células.
  - **Estadio ovocitario:** Los ovocitos en estadio de VG, M-I y M-II parecen ser los mejores candidatos a la liofilización.
  - **Células del cúmulus:** su presencia en ovocitos inmaduros parece reducir la tasa de ovocitos degenerados tras la rehidratación
  - **Almacenamiento** de las muestras liofilizadas depende del contenido de humedad residual tras la liofilización.
  - Una **rehidratación** más gradual podría mejorar los resultados
3. La utilización de material nuclear procedente de ovocitos liofilizados podría permitir generar embriones a partir del mismo, y por tanto ser una herramienta para la preservación de especies de interés, siendo una forma sostenible por tanto de almacenaje de material genético.

## CONCLUSIONS

Thanks to this literature review on the freeze-drying of mammalian oocytes, several conclusions have been drawn:

1. The large size of the oocytes increases the problem of penetration of lyoprotectants into the oocyte interior in the correct way, which complicates their protection during freeze-drying and compromises the results of the process.
2. Factors affecting oocyte freeze-drying and its results:
  - **Lyoprotectants:** no single lyoprotectant ensures survival and success after rehydration, the right combination of several will lead to the best results.
  - **Freeze-drying media** must have a high glass transition temperature to protect the cells.
  - **Oocyte stage:** VG, M-I and M-II stage oocytes appear to be the best candidates for freeze-drying.
  - **Cumulus cells:** their presence in immature oocytes seems to reduce the rate of oocyte degeneration after rehydration.
  - **Storage** of freeze-dried samples depends on the residual moisture content after freeze-drying.
  - A slow step by step **rehydration** could improve the results.
3. The use of nuclear material from freeze-dried oocytes could enable a generation of embryos from freeze-dried oocytes, this way being a tool for the preservation of species of interest, becoming a sustainable way of storing genetic material.

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de esta revisión bibliográfica me ha demostrado la importancia de las tecnologías de la reproducción, tanto para preservar especies animales como para preservar la fertilidad en medicina humana. A menudo me ha resultado muy agradable realizar este trabajo, la liofilización de ovocitos me parece un tema muy interesante. Me parece curioso que todavía no se haya encontrado la clave para asegurar el éxito de la liofilización en ovocitos cuando se ha conseguido en espermatozoides hace unos 70 años. Sin embargo, creo que reside en un campo importante de investigación que no hay que dejar de lado. Además, llevar a cabo esta revisión bibliográfica me ha permitido mejorar mis capacidades de análisis de documentos mediante la contrastación de información científica con el fin de articular mi trabajo. Por último, me gustaría agradecer a mi tutora Noelia por su dedicación, compromiso, transmisión de conocimientos y su apoyo que me ayudaron a mejorar constantemente en mi trabajo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Alexandrova, S., Arav, A., Hood, K., Natan, Y., Zhang, J. J., & Pasquale, P.** (2020). Successful production of normal euploid human blastocysts derived from sperm after partial freeze drying, rehydration and icsi: towards developing a novel method for safe storage of biological samples. *Fertility And Sterility*, 114(3), e37-e38. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.08.1412>
2. **Alzate, O., & Eduardo, C.** (2008). Congelación y liofilización de alimentos. *ResearchGate*.  
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10647>
3. **Arav, A.** (2020). From cryo-preservation to dry-preservation of reproductive cells. *Theriogenology*, 150, 263-267. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.060>
4. **Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garciarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A.** (2008). The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*, 148(1), 6-24.  
<https://doi.org/10.1104/pp.108.120725>
5. **Bebbere, D., Arav, A., Nieddu, S. M., Pietro Burrai, G., Succu, S., Patrizio, P., & Ledda, S.** (2021). Molecular and Histological Evaluation of Sheep Ovarian Tissue Subjected to Lyophilization. *Animals*, 11(12), 3407. <https://doi.org/10.3390/ani11123407>
6. **Best, B. P.** (2015). Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research*, 18(5), 422-436. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>
7. **Bialy, G., & Smith, V. R.** (1957). Freeze-Drying of Bovine Spermatozoa. *Journal Of Dairy Science*, 40(7), 739-745. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(57\)94548-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(57)94548-4)
8. **Choi, Y. H., Varner, D. D., Love, C. C., Hartman, D. L., & Hinrichs, K.** (2011). Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction*, 142(4), 529-538. <https://doi.org/10.1530/rep-11-0145>
9. **Clegg, J. S.** (1964). The Control of Emergence and Metabolism by External Osmotic Pressure and the Role of Free Glycerol in Developing Cysts of Artemia Salina. *Journal Of Experimental Biology*, 41(4), 879-892. <https://doi.org/10.1242/jeb.41.4.879>
10. **Cobo, A., García-Velasco, J. A., Remohí, J., & Pellicer, A.** (2021). Oocyte vitrification for fertility preservation for both medical and nonmedical reasons. *Fertility And Sterility*, 115(5), 1091-1101. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.02.006>
11. **Comizzoli, P., He, X., & Lee, P.** (2022). Long-term preservation of germ cells and gonadal tissues at ambient temperatures. *Reproduction & Fertility*, 3(2), R42-R50. <https://doi.org/10.1530/raf-22-0008>
12. **Crowe, J. H.** (2007). Trehalose As a “Chemical Chaperone”. En *Springer eBooks* (pp. 143-158).  
[https://doi.org/10.1007/978-0-387-39975-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-0-387-39975-1_13)

13. **Dang-Nguyen, T. Q., Nguyen, H. T., Nguyen, M. T., Somfai, T., Noguchi, J., Kaneko, H., & Kikuchi, K.** (2018). Maturation ability after transfer of freeze-dried germinal vesicles from porcine oocytes. *Animal Science Journal*, 89(9), 1253-1260. <https://doi.org/10.1111/asj.13067>
14. **Diaz-Garcia, C., Domingo, J., Garcia-Velasco, J. A., Herraiz, S., Mirabet, V., Iniesta, I., Cobo, A., Remohí, J., & Pellicer, A.** (2018). Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study. *Fertility And Sterility*, 109(3), 478-485.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.018>
15. **Erkut, C., Vasilj, A., Boland, S., Habermann, B., Shevchenko, A., & Kurzchalia, T. V.** (2013). Molecular Strategies of the *Caenorhabditis elegans* Dauer Larva to Survive Extreme Desiccation. *PloS One*, 8(12), e82473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082473>
16. **Eroglu, A.** (2010). Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: Intra- and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization, and development rates. *Cryobiology*, 60(3), S54-S59. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.07.001>
17. **Flor, I.** (2018). Liofilización de ovocitos en la especie ovina. Trabajo Fin de Grado en Veterinaria: Universidad de Zaragoza, facultad de Veterinaria. Zaragoza, España.
18. **Flosdorf, E.W., & Kimball, A.C.** (1939). Studies with H. pertussis: Maintenance of Cultures in Phase I. *Journal of Bacteriology*, 39(3):255-261. DOI: 10.1128/jb.39.3.255-261.1940
19. **Flosdorf, E.W., & Mudd, S.** (1935). Procedure and Apparatus for Preservation in "Lyophile" form of Serum and Other Biological Substances. *The Journal Of Immunology/The Journal Of Immunology*, 29(5), 389-425. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.29.5.389>
20. **García, R.; Romar, R.** (2017). EFECTO DEL FLUIDO FOLICULAR LIOFILIZADO EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS PORCINOS. Universidad de Murcia, facultad de Veterinaria. Murcia. España.
21. **Gil, L., Olaciregui, M., Luño, V., Malo, C., González, N., & Martínez, F.** (2014). Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm. *Reproduction In Domestic Animals*, 49(s4), 72-81. <https://doi.org/10.1111/rda.12396>
22. **Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J., & Bollwein, H.** (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562-571. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.007>
23. **Hand, S. C., Menze, M. A., Toner, M., Boswell, L., & Moore, D.** (2011). LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annual Review Of Physiology*, 73(1), 115-134. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142203>
24. **Hasan, M. M., Uddin, M. N., Ara-Sharmeen, I., Alharby, H. F., Alzahrani, Y., Hakeem, K. R., & Zhang, L.** (2019). Assisting Phytoremediation of Heavy Metals Using Chemical Amendments. *Plants*, 8(9), 295. <https://doi.org/10.3390/plants8090295>

25. **Hibshman, J. D., Clegg, J. S., & Goldstein, B.** (2020). Mechanisms of Desiccation Tolerance: Themes and Variations in Brine Shrimp, Roundworms, and Tardigrades. *Frontiers In Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.592016>
26. **Jamil, K., Crowe, J. H., Tablin, F., & Oliver, A. E.** (2005). Arbutin Enhances Recovery and Osteogenic Differentiation in Dried and Rehydrated Human Mesenchymal Stem Cells. *Cell Preservation Technology*, 3(4), 244-255. <https://doi.org/10.1089/cpt.2005.3.244>
27. **Jennings, T. A.** (1999). *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*.
28. **Kaneko, T., & Nakagata, N.** (2006). Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology*, 53(2), 279-282. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.06.004>
29. **Kaneko, T., & Serikawa, T.** (2012). Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 64(3), 211-214. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.01.010>
30. **Kaneko, T., Whittingham, D. G., Overstreet, J. W., & Yanagimachi, R.** (2003). Tolerance of the Mouse Sperm Nuclei to Freeze-Drying Depends on Their Disulfide Status1. *Biology Of Reproduction*, 69(6), 1859-1862. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.019729>
31. **Kazorgah, F. M., Govahi, A., Dadseresht, A., Kenari, F. N. P., Ajdary, M., Mehdizadeh, R., Derakhshan, R., & Mehdizadeh, M.** (2024). The effect of temperature and storage time on DNA integrity after freeze-drying sperm from individuals with normozoospermia. *Daehan Saengsik Uihak Hoeji/Clinical And Experimental Reproductive Medicine*, 51(1), 42-47. <https://doi.org/10.5653/cerm.2023.06093>
32. **Kusakabe, H., Szczygiel, M. A., Whittingham, D. G., & Yanagimachi, R.** (2001). Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 98(24), 13501-13506. <https://doi.org/10.1073/pnas.241517598>
33. **Lee, P., Adams, D. M., Amelkina, O., White, K. K., Moretti, L. A., Whitaker, M. G., & Comizzoli, P.** (2019). Influence of microwave-assisted dehydration on morphological integrity and viability of cat ovarian tissues: First steps toward long-term preservation of complex biomaterials at supra-zero temperatures. *PloS One*, 14(12), e0225440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225440>
34. **Letterie, G., & Fox, D.** (2020). Lawsuit frequency and claims basis over lost, damaged, and destroyed frozen embryos over a 10-year period. *F&S Reports*, 1(2), 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2020.06.007>
35. **Levi-Setti, P. E., Patrizio, P., & Scaravelli, G.** (2016). Evolution of human oocyte cryopreservation: slow freezing versus vitrification. *Current Opinion In Endocrinology, Diabetes And Obesity./Current Opinion In Endocrinology*, 23(6), 445-450. <https://doi.org/10.1097/med.0000000000000289>

36. Liu, J., Kusakabe, H., Chang, C., Suzuki, H., Schmidt, D. W., Julian, M., Pfeffer, R., Bormann, C. L., Tian, X. C., Yanagimachi, R., & Yang, X. (2004). Freeze-Dried Sperm Fertilization Leads to Full-Term Development in Rabbits. *Biology Of Reproduction*, 70(6), 1776-1781. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025957>
37. Loi, P., Anzalone, D. A., Palazzese, L., Dinnyés, A., Saragusty, J., & Czernik, M. (2021). Dry storage of mammalian spermatozoa and cells: state-of-the-art and possible future directions. *Reproduction, Fertility, And Development/Reproduction, Fertility And Development*, 33(2), 82. <https://doi.org/10.1071/rd20264>
38. Loi, P., Luso, D., Czernik, M., Zacchini, F., & Ptak, G. (2013). Towards storage of cells and gametes in dry form. *Trends In Biotechnology*, 31(12), 688-695. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.004>
39. Loi, L., Iuso, D., Ptak, G., Patrizio, P., & Arav, A. (2012). Lyophilized and rehydrated metaphase II (MII) ovine chromosomes maintain functionality upon transfer in fresh MII oocytes. *Fertility And Sterility*, 98(3), S20. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.075>
40. Loi, P., Matsukawa, K., Ptak, G., Clinton, M., Fulka, J., Nathan, Y., & Arav, A. (2008). Freeze-Dried Somatic Cells Direct Embryonic Development after Nuclear Transfer. *PLoS One*, 3(8), e2978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002978>
41. Luño, V., Gil, L., Olaciregui, M., González, N., Jerez, R. A., & De Blas, I. (2014). Rosmarinic acid improves function and in vitro fertilising ability of boar sperm after cryopreservation. *Cryobiology*, 69(1), 157-162. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.002>
42. Mazur, P. (2004). Principles of cryobiology. En CRC Press eBooks (pp. 3-65). <https://doi.org/10.1201/9780203647073.ch1>
43. Men, N. T., Kikuchi, K., Nakai, M., Fukuda, A., Tanihara, F., Noguchi, J., Kaneko, H., Linh, N. V., Nguyen, B. X., Nagai, T., & Tajima, A. (2013). Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 80(9), 1033-1044. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.001>
44. Ménézo, Y., Dale, B., & Cohen, M. (2010). DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*, 18(4), 357-365. <https://doi.org/10.1017/s0967199410000286>
45. Miyata, Y., Tokumoto, S., Sogame, Y., Deviatiarov, R., Okada, J., Cornette, R., Gusev, O., Shagimardanova, E., Sakurai, M., & Kikawada, T. (2019). Identification of a novel strong promoter from the anhydrobiotic midge, Polypedilum vanderplanki, with conserved function in various insect cell lines. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43441-x>
46. Motlagh, M. K., Sharafi, M., Zhandi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Soleimani, M., & Zeinoaldini, S. (2014). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in

- soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing process of ram sperm. *Cryobiology*, 69(2), 217-222. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.007>
47. **Muneto, T., & Horiuchi, T.** (2011). Full-term Development of Hamster Embryos Produced by Injecting Freeze-dried Spermatozoa into Oocytes. *Journal Of Mammalian Ova Research*, 28(1), 32-39. <https://doi.org/10.1274/jmor.28.32>
48. **Natan, D., Nagler, A., & Arav, A.** (2009). Freeze-Drying of Mononuclear Cells Derived from Umbilical Cord Blood Followed by Colony Formation. *PloS One*, 4(4), e5240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005240>
49. **Neild, D., Brouwers, J., Colenbrander, B., Agüero, A., & Gadella, B.** (2005). Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction And Development*, 72(2), 230-238. <https://doi.org/10.1002/mrd.20322>
50. **Neumann, S., Reuner, A., Brümmer, F., & Schill, R. O.** (2009). DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades. *Comparative Biochemistry And Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 153(4), 425-429. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.611>
51. **Olaciregui, M.** (2017). Desarrollo y puesta a punto de la técnica de liofilización espermática como método de preservación de material genético. Tesis doctoral: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
52. **Olaciregui, M., & Gil, L.** (2016). Freeze-dried spermatozoa: A future tool? *Reproduction In Domestic Animals*, 52(S2), 248-254. <https://doi.org/10.1111/rda.12838>
53. **Patrizio, P., Loi, L., & Arav, A.** (2012). Lyophilization and rehydration of bovine oocytes after vitrification: a new technological breakthrough. *Fertility And Sterility*, 98(3), S125-S126. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.463>
54. **Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S.** (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164(4172), 666. <https://doi.org/10.1038/164666a0>
55. **Pomeroy, K. O., Reed, M. L., LoManto, B., Harris, S. G., Hazelrigg, W. B., & Kelk, D. A.** (2019). Cryostorage tank failures: temperature and volume loss over time after induced failure by removal of insulative vacuum. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, 36(11), 2271-2278. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01597-5>
56. **Qiu, J., Matsukawa, K., & Edashige, K.** (2023). Equilibrium vitrification of oocytes using low concentrations of cryoprotectants. *Cryobiology*, 113, 104586. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104586>
57. **Rall, W. F., & Fahy, G. M.** (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature*, 313(6003), 573-575. <https://doi.org/10.1038/313573a0>

58. **Rebecchi, L., Guidetti, R., Borsari, S., Altiero, T., & Bertolani, R.** (2006). Dynamics of Long-term Anhydrobiotic Survival of Lichen-dwelling Tardigrades. *Hydrobiologia*, 558(1), 23-30. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1415-7>
59. **Rockinger, U., Funk, M., & Winter, G.** (2021). Current Approaches of Preservation of Cells During (freeze-) Drying. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 110(8), 2873-2893. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.018>
60. **Said, S., Maulana, T., Setiorini, S., Ibrahim, G., Ramadhan, M., & Christopher, E.** (2020). Effect of addition an amino acid or its combination with EDTA on DNA integrity and morphometry sperm heads of freeze-dried bovine spermatozoa. *Journal Of The Indonesian Tropical Animal Agriculture/Journal Of The Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 45(3), 189-196. <https://doi.org/10.14710/jitaa.45.3.189-196>
61. **Said, S., Setiorini, S., Adella, A., Sari, I., Fathaniah, N., & Maulana, T.** (2019). The effect of addition selected amino acids in extender semen on quality and DNA stability of frozen-thawed Sumba Ongole bull spermatozoa. *Jurnal Ilmu Ternak Veteriner/Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner*, 24(1). <https://doi.org/10.14334/jitv.v24i1.187>
62. **Saragusty, J., Anzalone, D. A., Palazzese, L., Arav, A., Patrizio, P., Gosálvez, J., & Loi, P.** (2020). Dry biobanking as a conservation tool in the Anthropocene. *Theriogenology*, 150, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.022>
63. **Saragusty, J., & Arav, A.** (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141(1), 1-19. <https://doi.org/10.1530/rep-10-0236>
64. **Saragusty, J., & Loi, P.** (2019). Exploring dry storage as an alternative biobanking strategy inspired by Nature. *Theriogenology*, 126, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.027>
65. **Satpathy, G. R., Török, Z., Bali, R., Dwyre, D. M., Little, E., Walker, N. J., Tablin, F., Crowe, J. H., & Tsvetkova, N. M.** (2004). Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization. *Cryobiology*, 49(2), 123-136. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.06.001>
66. **Sherman, J. K.** (1954). Freezing and Freeze-Drying of Human Spermatozoa. *Fertility And Sterility*, 5(4), 357-371. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)31685-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)31685-5)
67. **Shinyashiki, N., Yamamoto, W., Yokoyama, A., Yoshinari, T., Yagihara, S., Kita, R., Ngai, K. L., & Capaccioli, S.** (2009). Glass Transitions in Aqueous Solutions of Protein (Bovine Serum Albumin). *The Journal Of Physical Chemistry. B*, 113(43), 14448-14456. <https://doi.org/10.1021/jp905511w>
68. **Talburt, W. F., & Smith, O.** (1975). Potato processing /. Recuperado de <https://doi.org/10.5962/bhl.title.69159>
69. **Teixeira, J. C., & Huber, C. D.** (2021). The inflated significance of neutral genetic diversity in conservation genetics. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 118(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.2015096118>

70. **Tharasanit, T., & Thuwanut, P.** (2021). Oocyte Cryopreservation in Domestic Animals and Humans: Principles, Techniques and Updated Outcomes. *Animals*, 11(10), 2949. <https://doi.org/10.3390/ani11102949>
71. **Tilden, W.A.** (2009). A Short History of the Progress of Scientific Chemistry in Our Own Times, BiblioBazaar
72. **Twigg, J. P., Irvine, D. S., & Aitken, R. J.** (1998). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 13(7), 1864-1871. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.7.1864>
73. **Wakayama, S., Ito, D., Hayashi, E., Ishiuchi, T., & Wakayama, T.** (2022). Healthy cloned offspring derived from freeze-dried somatic cells. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31216-4>
74. **Wakayama, T., & Yanagimachi, R.** (1998). Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature Biotechnology*, 16(7), 639-641. <https://doi.org/10.1038/nbt0798-639>
75. **Weng, L.** (2021). Technologies and Applications Toward Preservation of Cells in a Dry State for Therapies. *Biopreservation And Biobanking*, 19(4), 332-341. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0130>
76. **Willsie, J. K., & Clegg, J. S.** (2002). Small heat shock protein p26 associates with nuclear lamins and HSP70 in nuclei and nuclear matrix fractions from stressed cells. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 84(3), 601-614. <https://doi.org/10.1002/jcb.10040>
77. **Wolkers, W. F., & Oldenhof, H.** (2020). Principles Underlying Cryopreservation and Freeze-Drying of Cells and Tissues. En *Methods in molecular biology* (pp. 3-25). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_1)
78. **Wolkers, W. F., Walker, N. J., Tablin, F., & Crowe, J. H.** (2001). Human Platelets Loaded with Trehalose Survive Freeze-Drying. *Cryobiology*, 42(2), 79-87. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2306>
79. **Yamada, T. G., Hiki, Y., Hiroi, N. F., Shagimardanova, E., Gusev, O., Cornette, R., Kikawada, T., & Funahashi, A.** (2020). Identification of a master transcription factor and a regulatory mechanism for desiccation tolerance in the anhydrobiotic cell line Pv11. *PLoS One*, 15(3), e0230218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230218>
80. **Zhang, M., Oldenhof, H., Sydykov, B., Bigalk, J., Sieme, H., & Wolkers, W. F.** (2017). Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: preservation of DNA integrity. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06542-z>