



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Vitrificación de ovocitos de la especie ovina: efecto del ácido rosmarínico

Ovine oocyte vitrification: effect of rosmarinic acid

Autor/es

Elena Velasco García

Director/es

Noelia González Ortí

Victoria Luño Lázaro

Facultad de Veterinaria

2020

---

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. Los gametos.....	4
2.2. Criopreservación de ovocitos: vitrificación vs congelación lenta tradicional..	5
2.3. Daños durante la vitrificación.....	8
2.4. Soluciones ante los problemas de la vitrificación.....	10
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
4.1 Material.....	16
4.1.1. Material biológico.....	16
4.1.2. Soluciones y medios.....	16
4.2 Método.....	17
4.2.1. Recolección y transporte de ovarios.....	17
4.2.2. Obtención de ovocitos.....	18
4.2.3. Maduración <i>in vitro</i> (MIV) y valoración.....	19
4.2.4. Vitrificación de ovocitos inmaduros.....	20
4.2.5. Desvitrificación de ovocitos y posterior maduración.....	22
4.2.6. Valoración de los ovocitos desvitrificados.....	23
4.2.7. Estudio estadístico.....	23
4.2.8. Diseño experimental.....	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
6. CONCLUSIONES.....	32
CONCLUSIONS.....	32
7. VALORACIÓN PERSONAL.....	32
8. BIBLIOGRAFÍA.....	33
9. ANEXOS: ÍNDICE DE FIGURAS, IMÁGENES, GRAFICAS Y TABLAS.....	38

## 1. RESUMEN

### **Vitrificación de ovocitos de la especie ovina: efecto del ácido rosmarínico**

La vitrificación de los ovocitos es un paso fundamental para la conservación de los recursos zoogenéticos. El desarrollo del embrión tras la criopreservación es menor que en embriones frescos. Son numerosos los estudios que profundizan en esta técnica y buscan nuevos métodos para hacer frente a las desventajas que presenta. La adición de antioxidantes a la solución de vitrificación puede suponer una mejora.

En base a ello, este estudio pretende evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de ácido rosmarínico sobre los medios de vitrificación para comprobar si aporta protección a los ovocitos durante la misma.

Nuestro estudio se realizó sobre ovocitos procedentes de ovarios de matadero de la especie ovina. Se seleccionaron los ovocitos y se dividieron en cuatro grupos. Uno de ellos no se vitrificó (control MIV), los otros tres grupos se vitrificaron en tres medios diferentes: control sin rosmarínico, rosmarínico 105  $\mu\text{M}$  y rosmarínico 150  $\mu\text{M}$ . El protocolo de vitrificación y desvitrificación fue el descrito por Sanaei *et al.*, 2018 y el uso del ácido rosmarínico siguió el protocolo de Borjizadeh *et al.*, 2019. Tras la desvitrificación y 24h de maduración *in vitro* de los ovocitos en TCM199 suplementado con hormonas y suero, se valoró la maduración nuclear mediante la tinción de fluorescencia Hoescht 33342.

Tras los resultados obtenidos, se puede concluir que la adición de ácido rosmarínico sobre los medios de vitrificación de ovocitos ovinos no supone una mayor protección de los mismos en dicho proceso de preservación. La posible causa de este resultado podría ser una concentración inadecuada de ácido rosmarínico. Es necesario el estudio de las concentraciones óptimas para esta especie, puesto que consideramos que puede ofrecer una correcta protección frente a los daños que sufren los ovocitos en la vitrificación.

## ABSTRACT

### **Ovine oocyte vitrification: effect of rosmarinic acid**

The vitrification of oocytes is a fundamental step in the conservation of animal genetic resources. The development of the embryo that occurs after cryopreservation is less than in fresh embryos. There are numerous studies that research this technique in depth and search for new methods to face the disadvantages it presents. The addition of antioxidants to the vitrification solution can be an improvement.

Based on this, this study aims to evaluate the effect of the addition of different concentrations of rosmarinic acid on the vitrification mediums to check if it provides protection to the oocytes during this process.

Our study was carried out on ovarian oocytes of the sheep species that proceeded from slaughterhouses. The oocytes were selected and divided into four groups. One of them was not vitrified (MIV control), the other three groups were vitrified in three different mediums: control without rosmarinic acid, rosmarinic acid 105  $\mu\text{M}$  and rosmarinic acid 150  $\mu\text{M}$ . The vitrification and devitrification protocol used was that of Sanaei et al, 2018 and the use of rosmarinic acid followed that of Borjizadeh et al, 2019. After devitrification and 24h in vitro maturation of the oocytes in TCM199 supplemented with hormones and serum, nuclear maturation was assessed using Hoescht 33342 fluorescence staining.

After the results obtained, it can be concluded that the addition of rosmarinic acid to the vitrification media of sheep oocytes does not suppose a greater protection of the same in said preservation process. The possible cause of this result could be an inadequate concentration of rosmarinic acid. It is necessary to study the optimal concentrations for this species, since we consider that it can offer correct protection against the damage suffered by oocytes in vitrification.

## 2. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la criopreservación de gametos tiene un gran interés dentro del campo de la biología, medicina y veterinaria. Esta técnica permite preservar la fertilidad, almacenar genética de nuestros mejores animales, e incluso proteger la biodiversidad en algunas especies que estén en peligro de extinción.

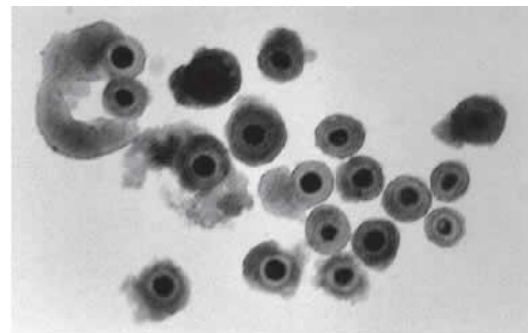
A lo largo de los años se han creado diferentes técnicas y protocolos para poder almacenar los gametos y embriones (Luvoni y Colombo, 2020). Uno de los métodos de criopreservación ovocitaria es la vitrificación, la cual se está convirtiendo en el más utilizado en centros de reproducción, por su alta eficacia y sus buenos resultados clínicos y embriológicos, de hecho, ha ido reemplazando con el tiempo a la congelación lenta tradicional (Cai *et al.*, 2018).

El primer éxito de la fecundación *in vitro*, con nacimiento de crías vivas fue a partir de ovocitos de ratón en 1976 y lo llevaron a cabo Parkening *et al.*

A partir de este logro científico, se presentaron resultados similares en distintas especies, como la primera vitrificación exitosa de embriones bovinos, la cual se logró usando como crioprotector una mezcla de glicerol y propanediol en altas concentraciones (Massip *et al.*, 1986). Posteriormente, se demostró por primera vez la competencia biológica de embriones caprinos (Yuswiati y Holtz, 1990) y ovinos a la criopreservación, a través de un método de vitrificación simple y rápido (Schiewe *et al.*, 1991), lográndose en ambos casos el nacimiento de crías viables.

### 2.1. Los gametos

El gameto femenino, el ovocito (**Imagen1**), es el encargado de transmitir la información genética del organismo femenino al futuro individuo. Los ovocitos son generados en el proceso de la ovogénesis en el ovario. Los gametos femeninos son células grandes, muy complejas y especializadas. Además, poseen características propias, como un mayor volumen y ciertas



**Imagen1:** Ovocitos de cordera

propiedades en la membrana plasmática, como su permeabilidad selectiva y su fluidez. Está rodeado por las células del cúmulo, formando el complejo cumulo-ovocito (COC), que permite establecer una red de interacción mutua, que proporciona nutrientes, un microambiente óptimo y factores que permiten la maduración y el desarrollo del ovocito (Gilchrist, Lane y

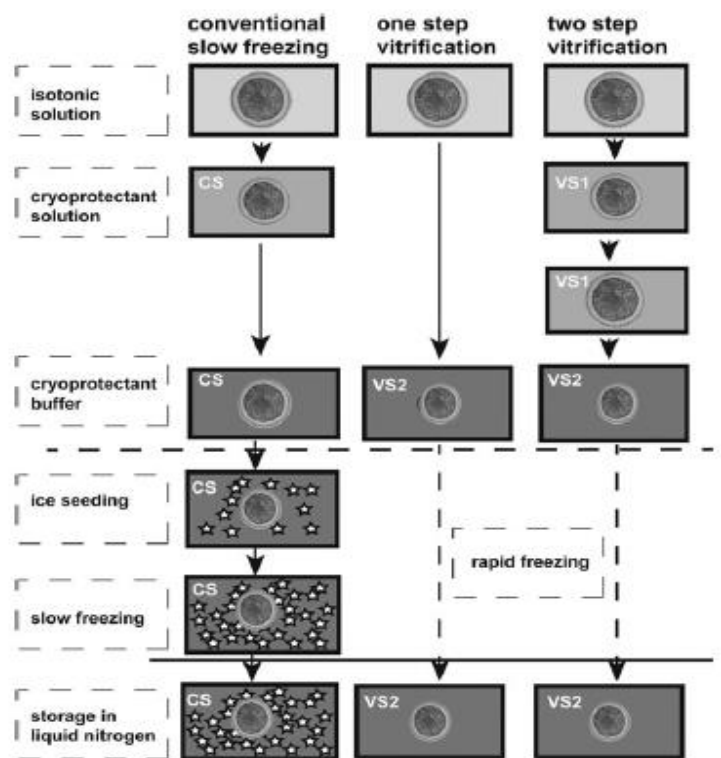
Thompson, 2008). Además, tienen una baja relación superficie/volumen y su ooplasma contiene cantidades significativas de gotas de lípidos citoplasmáticos.

En conjunto, estas características hacen que los ovocitos sean células muy sensibles a los daños que implica la criopreservación, tanto a nivel morfológico como funcional. Sus propiedades criobiológicas impiden un buen movimiento de agua y de los crioprotectores a través de su membrana celular, provocando daño en las membranas de orgánulos intracelulares y en el citoesqueleto, produciendo la formación de cristales de hielo, daños por fractura... En definitiva, provocando un estrés térmico, osmótico y oxidativo (Moussa *et al.*, 2014; Luvoni y Colombo, 2020).

## 2.2. Criopreservación de ovocitos: vitrificación vs congelación lenta tradicional

La conservación de células junto con su almacenamiento a bajas temperaturas es deseable tanto por razones biológicas como comerciales. Al conservar células a bajas temperaturas (-196°C) es posible detener por completo la actividad enzimática, la respiración celular, el metabolismo y el crecimiento, es decir, es posible mantener las células durante un largo periodo de tiempo sin afectar su viabilidad y sin causar cambios genéticos (Mazur, 1984). No obstante, la mayoría de las células de los mamíferos mueren cuando se someten a bajas temperaturas, a menos que previamente hayan sido expuestas a una solución que las proteja y a rangos de enfriamiento y calentamiento específicos y controlados (Albarracín Monje y Mogas Amorós, 2005).

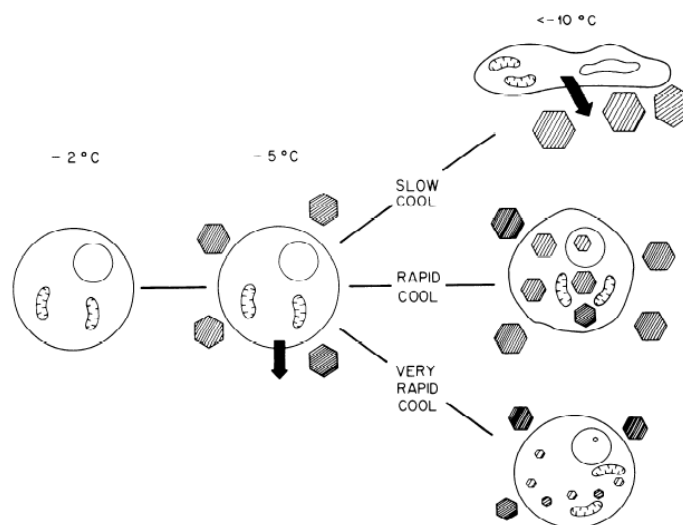
La criopreservación de gametos implica el contacto con soluciones crioprotectoras, su congelación y finalmente, su almacenamiento a temperaturas bajo cero. Una vez descongelados, se procede a la dilución y posterior eliminación de los crioprotectores, para luego ser transferidos a una solución que permita el desarrollo adecuado de las células. Estos pasos suponen un gran estrés (osmótico, oxidativo y térmico) celular al cual deben de sobrevivir (Moussa *et al.*, 2014). Los protocolos de criopreservación han sido clasificados como



**Figura 1:** Pasos en congelación lenta tradicional y vitrificación (Quan, Wu y Hong, 2017)

lentos o rápidos en función de la velocidad de enfriamiento y el tipo y concentración de crioprotector utilizado (**Figura 1**).

La técnica de congelación lenta de ovocitos consiste en conseguir un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento, la velocidad de deshidratación y la velocidad de formación de núcleos de hielo. El objetivo principal es controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma que a medida que desciende la temperatura se produzca la penetración del crioprotector al interior de la célula, produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares (**Figura 2**)(Labrune *et al.*, 2020). Para prevenir la formación de hielo intracelular o minimizar el daño que éste pueda causar, todos los protocolos de congelación están destinados a deshidratar las células. Este objetivo se consigue colocando a las células en una solución con crioprotectores. Después, la temperatura disminuye y se produce la formación de cristales de hielo dentro de la solución. Conforme los cristales de hielo crecen, el agua de la solución pasa de líquido a sólido, y la concentración extracelular de solutos se incrementa, provocando la salida del agua de la célula. El éxito en los protocolos de congelación lenta consiste en alcanzar un equilibrio entre la velocidad a la que el agua abandona la célula y la velocidad a la que el agua se convierte en hielo(Albarracín Monje y Mogas Amorós, 2005).



**Figura 2:** Formación de cristales durante la congelación (Mazur, 1984)

Por otra parte, la vitrificación consiste en sumergir las muestras directamente en nitrógeno líquido, y así disminuir más rápido la temperatura. Se usan soluciones con mayores concentraciones de crioprotectores y volúmenes muy pequeños de medio, para evitar la alteración de la estructura y función de las células (Luvoni y Colombo, 2020). Durante el proceso de vitrificación, se hacen pases sucesivos de los ovocitos por unos medios de equilibrado con

concentraciones crecientes de crioprotectores. Así, las células se deshidratan rápidamente y se favorece la entrada de los crioprotectores, para, seguidamente, colocarlos en un soporte de vitrificación con el menor volumen de medio posible. Con la rápida bajada de temperaturas aumenta la viscosidad hasta un punto en el que las moléculas se inmovilizan, quedando la muestra en un estado sólido, pero estando su estructura molecular constituida por un líquido extremadamente viscoso (Critser, Agca y Gunasena, 1997). Para poder conseguir dicha viscosidad, es necesario someter a la muestra a velocidades de enfriamiento ultrarrápidas, superiores a 2500°C por minuto, de ahí la necesidad de la adición de gran cantidad de agentes crioprotectores (concentraciones entre 5 y 7 M) que aporten protección (Vajta, 2020). Las tasas de conservación conseguidas con la vitrificación disminuyen drásticamente el daño por enfriamiento, dado el uso de soluciones de crioprotectores más concentradas como se ha mencionado, y también el acortamiento en el tiempo de exposición del ovocito a dichos crioprotectores (Martino, Pollard y Leibo, 1996). Es por ello que con esta técnica, la gran ventaja es que no se forman cristales de hielo durante el enfriamiento y calentamiento, intracelulares ni extracelulares (Albarracín Monje y Mogas Amorós, 2005), ya que atraviesa el rango de temperatura de +15 a -5°C a velocidades de enfriamiento muy rápidas, disminuyendo los efectos osmóticos causados por la formación de hielo extracelular, mejorando así el ratio de supervivencia de los gametos (Moussa *et al.*, 2014).

Otra gran ventaja de esta técnica es que no requiere de equipos de congelación caros o sofisticados y se puede realizar de manera muy sencilla (**Tabla 1**).

**Tabla 1:** vitrificación vs congelación lenta tradicional (Moussa *et al.*, 2014)

Vitrificación	Congelación lenta tradicional
<b>Simple, rápida, menos de 10 minutos</b>	Más de tres horas
<b>Barata, no se necesita máquina</b>	Cara, biocongelador necesario
<b>Volumen de 1-2 µL</b>	Volúmenes de 100-250 µL
<b>No se forman cristales de hielo en el interior</b>	Formación de cristales de hielo en el interior
<b>Menor daño mecánico</b>	Mayor daño mecánico
<b>Mayor daño químico</b>	Menor daño químico
<b>Sistema abierto o cerrado</b>	Solo sistema cerrado
<b>Mayor concentración de crioprotectores</b>	Menor concentración de crioprotectores

La consecuencia negativa que puede ocasionar esta técnica es el incremento de probabilidades de lesionar las células debido al choque osmótico y a la toxicidad de los crioprotectores. Para



solucionar este problema, se han aplicado diferentes protocolos con el fin de disminuir los efectos negativos, con el uso de crioprotectores menos tóxicos o utilizando una combinación de crioprotectores (Vajta, 2020). En el caso de la especie ovina existen multitud de posibles alternativas con diferentes resultados, los cuales raramente pueden ser extrapolados a otras especies(Quan, Wu y Hong, 2017)(**Tabla 2**).

**Tabla 2:** Tasas de supervivencia, división y desarrollo a blastocisto de ovocitos de oveja, usando diferentes combinaciones de crioprotectores(Quan, Wu y Hong, 2017).

<i>Oocyte stage</i>	<i>Cryodevice</i>	<i>Cryoprotectant</i>	<i>% survival</i>	<i>% cleavage</i>	<i>% blastocyst</i>	<i>Reference</i>
MII	Cryotop	DMSO+EG	NA	41.59	7.08	Succu et al. <sup>7</sup>
MII	OPS	DMSO+EG	NA	11.58	0	Succu et al. <sup>122</sup>
	Cryoloop	DMSO+EG		26.67	3.33	
	Cryotop	DMSO+EG		42.86	0	
GV	BES	EG	21	6	0	Fernández-Reyez et al. <sup>126</sup>
	SOPS		30	9	3	
	Cryotop		21	10	0	
GV	Cryotop	DMSO+EG	66.2	38.1±3.2	8.2±1.2	Shirazi et al. <sup>142</sup>
GV	Cryotop	DMSO+EG	NA	48.7±3.8	8.2±2.6	Naderi et al. <sup>134</sup>
GV	Cryoloop	DMSO+EG	NA	42.9	12.3	Moawad et al. <sup>106</sup>
MII	Cryotop	DMSO+EG	~90	~17	0	Hosseini et al. <sup>141</sup>
GV	Straw	DMSO+EG	67.42±2.17	7.96±0.97	0	Quan et al. <sup>129</sup>
	OPS		85.78±1.82	19.84±1.62	4.98±0.71	
	Cryoloop		84.24±3.18	22.46±2.31	8.24±0.93	
GV	SSV	EG	74.8	9.6	0.5	Moawad et al. <sup>127</sup>
MII	SSV	EG+DMSO	84.6±2.7	46.8±2.7	2.6±4.8	Zhang et al. <sup>130</sup>
MII	OPS	EG+DMSO	55	11.58	0	Succu et al. <sup>122</sup>
	Cryoloop		80	26.67	12.5	
	Cryotop		77.2	42.86	0	
MII	OPS	EG+DMSO	66.00	34.25	4.86	Mo et al. <sup>22</sup>
GV	Cryoloop	EG+DMSO	90.1	25.0	4.5	Moawad et al. <sup>106</sup>
MII	Cryotop	EG+DMSO	96.9±1.9	23.9±2.6	3.83	Hosseini et al. <sup>143</sup>
GV	Sharpened	EG+DMSO	73±0.02	35±0.02	0.15	Shirazi et al. <sup>133</sup>
MII	Straw		66±0.03	41±0.05	0	
GV	OPS	EG+DMSO	76.0±10.2	13.4±4.1	5.4±3.0	Bhat et al. <sup>8</sup>
MII	Cryotop	EG+DMSO	82.66	32.3	1.6	Succu et al. <sup>144</sup>

### 2.3. Daños durante la vitrificación

#### - Estrés osmótico

De todas las lesiones que se producen durante el proceso de vitrificación, el estrés osmótico es el más común, y está causado por la diferencia de presión osmótica entre los espacios intracelular y extracelular. Por otro lado, durante la desvitrificación de las células, éstas son más permeables al agua que los agentes crioprotectores, lo cual provoca que las células se hinchen, e incluso se llegue a romper su membrana celular (Moussa *et al.*, 2014). Debido al estrés osmótico mencionado, se producen modificaciones en la forma celular, que conduce a alteraciones en el citoesqueleto. Así mismo, se compromete la función de las mitocondrias, que puede activar diferentes vías apoptóticas y puede romper la zona pelúcida, produciendo la

exocitosis de gránulos corticales. También se pueden perder las conexiones entre el ovocito y el cúmulus, haciendo que se produzca la fragmentación del ADN, dando lugar a anomalías cromosómicas y modificaciones epigenéticas(Luvoni y Colombo, 2020).

La vitrificación exitosa de los ovocitos, con la menor pérdida de morfología y funcionalidad en los mismos, es una de las metas a llevar a cabo en las tecnologías de reproducción asistida (Borjizadeh *et al.*, 2019).

- Estrés oxidativo

Otro de los principales problemas que acontecen en la vitrificación es el estrés oxidativo que sufren las células. El estrés oxidativo puede ser definido como un desbalance entre las moléculas oxidantes y los antioxidantes, lo que genera un estado de estrés en la célula (Ma, 2010). Los ovocitos, con la pérdida de su sistema de defensa, que se ocupa de preservar su estructura celular, quedan expuestos a la toxicidad de los radicales libres de los crioprotectores (Comporti, 1989), produciendo la peroxidación lipídica y afectando así a la estructura y función de la membrana de los ovocitos, a su fluidez y a su función (Freeman y Crapo, 1982). También se ha propuesto que la reparación de las estructuras celulares requiere la generación de energía con un aumento posterior en la producción de ROS (Odani *et al.*, 2003). El estrés oxidativo asociado con la crioconservación se manifiesta posteriormente en perturbaciones en la función metabólica y los patrones de expresión génica (Dehghani *et al.*, 2019).

Los ovocitos sometidos a algún método de crioconservación muchas veces están deteriorados y tienen una capacidad meiótica reducida, por lo que la tasa de supervivencia y fecundación de los mismos después de la desvitrificación permanece baja (Dinara *et al.*, 2001). Se ha demostrado que los antioxidantes son efectivos para reducir el estrés oxidativo en ovocitos y embriones de mamíferos durante la criopreservación. De hecho, varios autores han demostrado que el ascorbato adicionado al medio de criopreservación mejora el desarrollo del embrión en el caso del ratón, y la viabilidad de los blastocistos obtenidos después de la congelación o la vitrificación (Tarin *et al.*, 1993; Lane, 2002).

Por lo tanto, el principal desafío es encontrar soluciones óptimas de crioprotectores, junto con la concentración adecuada de antioxidantes. Es factible que la inclusión de un antioxidante en los crioprotectores ayude a mantener la viabilidad de los ovocitos después del procedimiento de crioconservación al reducir los efectos de los ROS(Lane, 2002).

- Estrés térmico

El estrés térmico ocurre entre +15 y -5°C generalmente. Produce cambios parcialmente irreversibles en las membranas ricas en lípidos, así como en el huso meiótico. Normalmente, el estrés térmico es más común en la congelación lenta tradicional debido a que la vitrificación implica una velocidad de enfriamiento alta, y la célula se ve sometida durante menos tiempo a estos rangos de temperatura (Moussa *et al.*, 2014). Todas estas lesiones que los ovocitos pueden sufrir, hacen que tanto su supervivencia como su tasa de funcionalidad sea baja, por lo que los estudios actuales se centran en buscar las soluciones óptimas de crioprotectores.

#### **2.4. Soluciones ante los problemas de la vitrificación**

El factor más crítico para la criopreservación de ovocitos es su compleja organización subcelular. Algunas estructuras como la zona pelúcida, la membrana plasmática, el huso meiótico, el citoesqueleto y las mitocondrias son muy susceptibles a los cambios de temperatura (Pereira y Marques, 2008). Además, hay que tener en cuenta que los ovocitos son unicelulares, por lo que las consecuencias del daño producido en los procesos de conservación son mayores que en estructuras multicelulares como los embriones.

Existen grandes diferencias entre las diferentes especies de animales domésticos en cuanto a la sensibilidad de los ovocitos al enfriamiento y la congelación, debido a las distintas concentraciones de lípidos que presentan (Mullen y Fahi, 2012; Arav, 2014). Los ovocitos porcinos son extremadamente sensibles a las bajas temperatura y a la congelación debido a su alto contenido lipídico, al contrario que los ovocitos de ratón. El contenido de lípidos en los ovocitos de oveja es menor que el de los ovocitos de cerdo, pero mayor que el de los ovocitos bovinos, por lo que los ovocitos de oveja pueden ser más susceptibles a la crioconservación en comparación con los ovocitos bovinos (Mullen y Fahi, 2012).

También debemos tener en cuenta el estadio de maduración meiótica del ovocito a criopreservar, ya que puede influir en sus posibilidades de supervivencia. Algunos estudios realizados en ovocitos de humana como el de Son *et al.*, en 2019, vieron que la vitrificación de ovocitos inmaduros y un buen protocolo posterior de maduración *in vitro*, podían ayudar a mantener la misma calidad de ovocitos antes y después de la vitrificación, lo que mejoraba la calidad de los embriones y las tasas de embarazo. En la etapa de la vesícula germinal (GV), las células del cúmulo pueden bloquear el movimiento de los crioprotectores, por lo que la sensibilidad de los ovocitos GV a la crioconservación podría ser mayor que la de los ovocitos en metafase II (Quan *et al.*, 2014; Ahmadi *et al.*, 2019). No obstante, en los ovocitos en GV los microtúbulos aún no están organizados en forma de huso y el material genético está dentro del

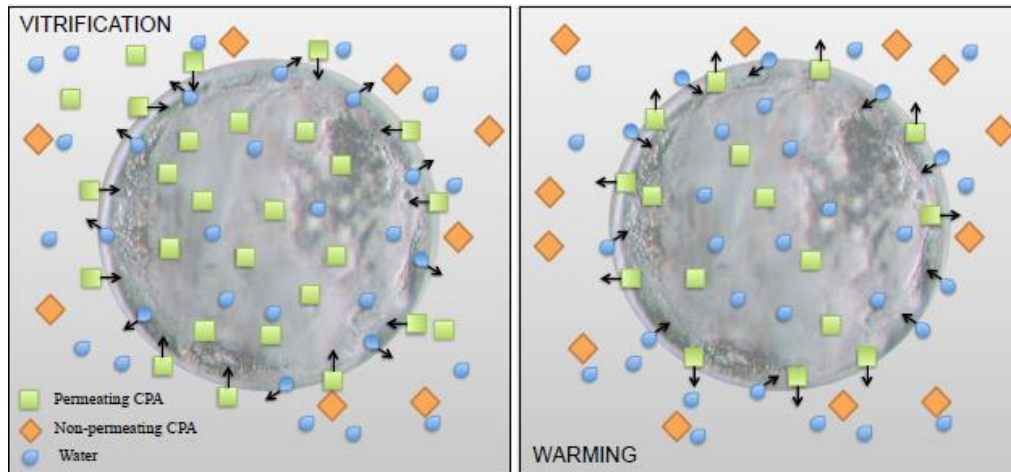
núcleo, protegido por la membrana nuclear, lo cual puede ser una protección frente al daño producido por la vitrificación (Arav *et al.*, 1993).

Para que las lesiones producidas durante el proceso de criopreservación sean las menos posibles, se han estudiado diferentes puntos críticos y se han desarrollado diferentes técnicas o estrategias para solventarlos en varios estudios:

-Equilibrado de los crioprotectores antes del enfriamiento: Para evitar la formación de cristales de hielo. Según varios estudios cuanto más corto es el tiempo de equilibrio, mejores resultados se obtienen en la vitrificación (Moussa *et al.*, 2014).

-Tipo de crioprotectores: Los crioprotectores se clasifican, desde un punto de vista farmacológico, como drogas de acción inespecífica que permiten a las células sobrevivir a la congelación del agua a través de diferentes mecanismos, es decir, no consiguen su efecto actuando directamente sobre receptores, enzimas o genes específicos. Los crioprotectores, son solubles en medios acuosos y tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno. Existen diferentes tipos como alcoholes, aminas, azúcares, sales inorgánicas y macromoléculas. Los crioprotectores actúan evitando los daños causados por la congelación, sobre la formación de cristales de hielo y sobre la deshidratación de la célula. Entre los crioprotectores se pueden distinguir dos tipos (**Figura 4**):

- Crioprotectores permeables: Éstos son capaces de atravesar la membrana plasmática, de forma activa o pasiva gracias a su bajo peso molecular. Dentro de este tipo se encuentran los alcoholes como el glicerol, etilenglicol, propilenglicol o el sorbitol, las aminas como la acetamida, betaína, lisina o la taurina (Shaw, Ward y Trounson, 1995). Producen una reorganización de los componentes lipídicos y proteicos de la célula, incrementando de esta forma su fluidez, favoreciendo la deshidratación y disminuyendo la formación de cristales intracelulares (Holt, 2000).
- Crioprotectores no permeables: Éstos no son capaces de atravesar la membrana plasmática, por su elevado peso molecular y su compleja estructura. Su principal función es elevar la presión osmótica del medio, disminuyendo así la cantidad requerida de crioprotector permeable y por tanto su toxicidad (Shaw, Ward and Trounson, 1995). Esta producción de un medio hipertónico hace que salga agua de las células, y de esta forma se deshidraten, disminuyendo a su vez la posibilidad de formación de cristales de hielo en su interior (Moore *et al.*, 2006). Dentro de este grupo encontramos la albúmina sérica bovina, la polivinilpirrolidona, o los azúcares tanto monosacáridos, disacáridos y trisacáridos.



**Figura 3.** Movimiento de los diferentes tipos de crioprotectores y del agua durante los procesos de vitrificación y desvitrificación (Castillo-Martí *et al.*, 2013)

El estudio de Sudiman *et al.*(2019) investigó la tolerancia a diferentes crioprotectores tras la vitrificación en ovocitos de ratón y de cordera, observando que según la especie se mostraban diferentes tolerancias a los efectos citotóxicos de los crioprotectores utilizados en el procedimiento de vitrificación. Destacaron una alta sensibilidad de los ovocitos de cordera a las lesiones por frío y a la toxicidad crioprotectora durante la vitrificación, por lo que las combinaciones de crioprotectores tienen que ser cuidadosamente seleccionadas para esta especie, para así optimizar las tasas de éxito y la supervivencia y desarrollo posterior del embrión.

En un estudio de Berlinguer *et al.*, (2007) también se había concluido que la trealosa en el medio de maduración estabilizaba las membranas celulares durante la vitrificación y calentamiento de los ovocitos ovinos de hembras prepúberes, pero no afectaba la fecundación y tasas de escisión después del calentamiento. Recientemente, Sanaei *et al.*(2018) han determinado que los ovocitos maduros ovinos vitrificados en soluciones que contienen trealosa 0,5 M son competentes para la fecundación, pudiendo formar blastocistos de calidad con un bajo índice apoptótico. Por lo que consideraron que 0,5 M podría ser la concentración óptima de trealosa para ser usada en soluciones para la vitrificación de ovocitos de la especie ovina.

-Impedir el endurecimiento de la zona pelúcida: Este problema se puede solucionar usando suero fetal bovino(Carroll, Wood y Whittingham, 1993).

-Disminución de la sensibilidad de los ovocitos al frío: La sensibilidad de los ovocitos suele ser debida al gran número de gotas de lípidos en el citoplasma, que se puede solucionar mediante su eliminación mecánica o añadiendo L-carnitina en los medios de cultivo(Moawad *et al.*, 2013).

-Incrementar la velocidad de congelación y descongelación: Existe una velocidad de enfriamiento límite, que es la velocidad máxima que puede soportar una célula a una determinada concentración de crioprotector. Por lo que, el equilibrio entre la máxima velocidad de congelación y la concentración de crioprotector será de gran importancia para conseguir buenos resultados (Critser, Agca y Gunasena, 1997). Como principal estrategia, se realiza el paso de temperatura crítica lo más rápido posible, para disminuir el riesgo de daño celular y llevar a la célula hasta la temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ . La célula que ha sido vitrificada y almacenada a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$ , deberá ser descongelada a temperaturas óptimas, para ello se sumerge la muestra de vitrificación en un medio a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y así tratar de disminuir o eliminar la probabilidad de recristalización (Hochi *et al.*, 1998), evitando lesiones.

El aumento de la velocidad de congelación también se puede conseguir disminuyendo el volumen de la solución en el que se van a vitrificar los ovocitos, usando diferentes soportes o instrumentos como criotops, crioloops, OPS... (Moussa *et al.*, 2014).

En el estudio de Pujol *et al.*, (2019) en el que compararon dos soportes de vitrificación, que fueron el método cerrado Rapid-i y el método abierto Cryotop, vieron que el método cerrado permitía tasas de supervivencia mayores, pero menor tasa de fecundación en comparación con el método abierto. Pero ambos métodos tenían una competencia de desarrollo similar.

- Disminuir los efectos negativos de los ROS: Incluyendo soluciones óptimas de un antioxidante en los crioprotectores, tales como ácido rosmarínico, ácido ascórbico, resveratrol, etc(Lane, 2002). Se ha demostrado que con los antioxidantes, los ovocitos mejoran el ensamblaje del huso, la alineación cromosómica y la distribución mitocondrial. El uso de antioxidantes, da como resultado una mejora significativa en la calidad de los ovocitos de la metafase II (MII) y el posterior desarrollo de blastocistos(Moawad *et al.*, 2014), en definitiva protege a los ovocitos contra el estrés oxidativo (Truong, Soh y Gardner, 2016).

El ácido rosmarínico, es un ácido cafeico que se encuentra en una gran variedad de plantas, como el romero. Gracias a sus características, el ácido rosmarínico sirve como antioxidante para disminuir la apoptosis de las células y conservar la fertilidad, así como la funcionalidad e integridad de la membrana plasmática celular (Murray *et al.*, 2001). *Rosmarinus officinalis*, se usa como tratamiento en múltiples enfermedades, como son la diabetes, enfermedades pulmonares e inflamatorias y complicaciones nerviosas. Está demostrado que el ácido rosmarínico posee moléculas antioxidantes(Al-Sereiti, Abu-Amer y Sen, 1999). Los compuestos fenólicos, poseen funciones biológicas como inhibir la oxidación, efectos antitrombóticos y prevenir la mutación y oxidación del ADN (Hong *et al.*, 2004).

Al igual que el ácido rosmarínico, que posee estas características antioxidantes, existen otros ácidos, como el ácido ascórbico con unas cualidades parecidas, que previenen o disminuyen la oxidación de las biomoléculas.

En sendas investigaciones de Ahmadi *et al.* (2019) y de dos Santos Morais *et al.* (2019), se comprobó que el uso de antioxidantes como ácido ascórbico, N-acetil cisteína, anetol y robinina en la vitrificación de ovocitos ovinos, mejoraban la competencia de desarrollo y mantenían mejor la morfología folicular.

Borjizadeh *et al.* (2019) determinaron que la inclusión de ácido rosmarínico (105  $\mu\text{mol/L}$ ) y ascórbico en la solución de vitrificación en ovocitos de ratones mejoraba la supervivencia, la maduración de los ovocitos, la tasa de fecundación y finalmente el desarrollo a la etapa de 4 células.

Chinen *et al.* en 2020 investigaron el antioxidante resveratrol, para determinar si protegía los ovocitos bovinos de las lesiones producidas por la vitrificación. Los resultados mostraron que este antioxidante a concentraciones 1  $\mu\text{M}$  puede mejorar el potencial de desarrollo para la etapa de blastocisto después de la fecundación *in vitro* y el cultivo *in vitro*. Por lo tanto, el tratamiento a corto plazo con resveratrol puede rescatar a los ovocitos M-II bovinos de las lesiones de vitrificación, con un alto rendimiento de los ovocitos vitrificados (42,4%), en comparación con el del grupo control (49,0%).

Otro estudio realizado con antioxidantes fue el de Truong y Gardner en 2020. En él utilizaban la combinación de tres antioxidantes, acetil-L-carnitina, N-acetil-L-cisteína y ácido  $\alpha$ -lipoico, en soluciones de vitrificación para ovocitos de ratón. La combinación de los 3 antioxidantes, proporcionaba grandes beneficios en la fecundación *in vitro* de ratones y el cultivo de embriones (Truong *et al.*, 2016; Truong y Gardner, 2017), ya que los antioxidantes proporcionan una protección significativa contra los efectos perjudiciales de los radicales de oxígeno durante la vitrificación, lo que favorece el desarrollo embrionario. Los datos indicaron que los antioxidantes tenían que estar presentes en todas las etapas de las manipulaciones *in vitro* (Truong y Gardner, 2017), especialmente en momentos de alto estrés oxidativo como la vitrificación (Lane *et al.*, 2002).

Después de valorar varios de los factores que intervienen en la vitrificación, podemos concluir en que el método general para llevar a cabo la vitrificación consiste en exponer los ovocitos a una solución de vitrificación que contenga crioprotectores en concentraciones crecientes (hasta un 40%). Después de esto, se carga el ovocito en un volumen muy pequeño de medio y se sumerge en nitrógeno líquido directamente. Al igual que la velocidad de enfriamiento tiene que

ser lo más rápida posible para evitar efectos perjudiciales en el ovocito, la velocidad de calentamiento también deberá ser muy rápida para conseguir resultados óptimos. Posteriormente, tras el calentamiento, los ovocitos tienen que pasar por soluciones con concentraciones decrecientes de crioprotector, para poder rehidratarse y eliminar los crioprotectores.

Tal y como se ha descrito anteriormente, a lo largo del tiempo se han estudiado diferentes métodos de vitrificación para mejorar los resultados obtenidos, usando volúmenes más bajos, velocidades de congelación mucho más rápidas, concentraciones más bajas de crioprotectores para evitar sus efectos tóxicos y el uso de soluciones óptimas de antioxidantes en los crioprotectores para proteger a los ovocitos del estrés oxidativo (Borini y Bianchi, 2010).

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La posibilidad de almacenar genética de nuestros mejores animales hoy en día es un hecho, y la vitrificación de ovocitos es una opción válida. Los ovocitos, son unas células muy sensibles a los daños que implica la criopreservación, tanto a nivel morfológico como funcional, provocados por el estrés térmico, osmótico y oxidativo. Por ello, establecer un sistema de preservación menos lesivo supondría una mejora en el mantenimiento de la genética, y una óptima utilización de la misma.

La vitrificación actualmente está siendo muy utilizada para este fin, pero hay que tener en cuenta que sobre ella influyen factores relacionados con el propio ovocito: ausencia o presencia de células del cúmulus, así como grado de madurez. También influyen factores técnicos: crioprotectores y antioxidantes utilizados, soportes o la rampa de descenso de temperatura.

Por todo ello, el **objetivo** general del presente estudio es valorar el efecto de diferentes concentraciones del antioxidante ácido rosmarínico sobre los medios de vitrificación, para determinar el efecto protector sobre los ovocitos ovinos durante la misma.



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Material biológico

Los ovocitos utilizados en este estudio se obtuvieron a partir de ovarios de corderas procedentes del matadero local Mercazaragoza (Zaragoza, Aragón). Se llevaron a cabo 6 experiencias en las que se utilizaron un total de 381 ovarios (**Imagen 2**).



**Imagen 2:** Ovarios de cordera

#### 4.1.2. Soluciones y medios

Los reactivos químicos utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich S.A. Química (Madrid, España), salvo que se indique lo contrario.

La **tabla 3** recoge los medios utilizados para el procesado de los ovarios y los ovocitos.

**Tabla 3:** Medios para la obtención y maduración de ovocitos

MEDIO	COMPOSICIÓN
Medio de transporte	Suero salino fisiológico
Medio base (TCM 199H)	TCM 199H + HEPES (2,38 mg/ml)
Medio de aspiración	TCM 199H + heparina (1%)
Medio de lavado	TCM 199H + estrógenos
Medio de maduración <i>in vitro</i> (MIV)	TCM 199H + suero oveja (10%), FSH (5 mg/ml), glutamina (270 µg/ml) y piruvato (41 µg/ml)
Medio de desnudación	TCM 199H + hialuronidasa (20%)

En la vitrificación y equilibrado, las soluciones se elaboran a partir de un medio base, como se ve en la **tabla 4**, al igual que los medios de desvitrificación. El medio de vitrificación se suplementó con diferentes concentraciones de ácido rosmarínico (0 $\mu$ M, 105  $\mu$ M, 150  $\mu$ M) según el grupo al que pertenecían los ovocitos.

**Tabla 4:** Medios utilizados en la vitrificación y desvitrificación

MEDIO	COMPOSICIÓN
<b>Medio base (MB)</b>	PBS + 20% suero fetal bovino (SFB)
<b>Medio de equilibrado</b>	MB + 7,5% EG + 7,5% DMSO
<b>Medio de vitrificación</b>	MB + 15% EG + 15% DMSO + 0,5M Trealosa
<b>Medios de desvitrificación (D)</b>	D1: 10 ml MB + 0,5M trealosa D2: 2 ml D1+ 2ml SB D3: 2ml D2+ 2ml SB

Para la desvitrificación se prepararon tres medios de desvitrificación, compuestos por diferentes concentraciones decrecientes de trealosa, de forma que: D1, trealosa 0,5 M (1,89 gr/ 10 ml MB), D2, trealosa 0,25 M (2 ml D1 + 2 ml MB) y D3, trealosa 0,125 M (2 ml D2 + 2ml MB).

## 4.2. Método

### 4.2.1. Recolección y transporte de ovarios

Se recolectaron ovarios de corderas en la línea de faenado del matadero Mercazaragoza. Fueron transportados hasta el laboratorio en un recipiente isoterma (**Imagen 3**), para mantener la temperatura de los ovarios en torno a 30°C. A la llegada al laboratorio, los ovarios fueron lavados con suero fisiológico atemperado y se mantuvieron en un recipiente al baño maría (**Imagen 4**) para seguir manteniendo la temperatura de 30°C.



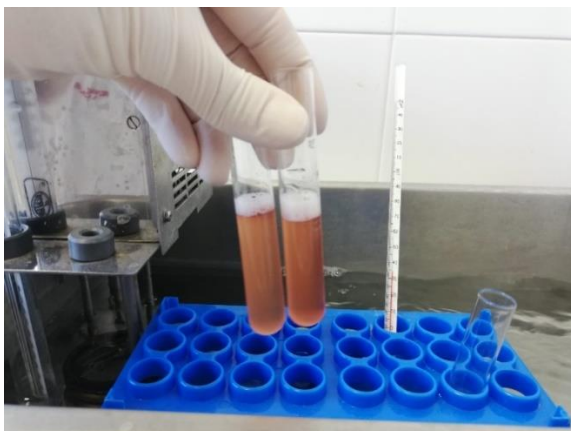
**Imagen 3:** Recipiente isoterma para el transporte de los ovarios (30°C)



**Imagen 4:** Ovarios en baño maría a 30°C

#### 4.2.2. Obtención de ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron por el método de aspiración, para ello se usó una aguja de 23G acoplada a una jeringa de 5 ml de volumen. Antes de la aspiración de los ovocitos, con la aguja y la jeringa se aspiró alrededor de 1 ml de medio de aspiración, para que toda la jeringa quedara impregnada del medio y así los ovocitos no se quedaran pegados en las paredes de la misma. Se procedió así a la aspiración de todos los folículos presentes en los ovarios. Todo el contenido se iba depositando en dos tubos de ensayo, que contenían parte del medio de aspiración (**Imagen 5**). Con la ayuda de una micropipeta se eliminó todo el sobrenadante y se recuperó el sedimento, lugar en el que se encontraban todos los ovocitos (**Imagen 6**).



**Imagen 5:** Tubos de ensayo con el resultado de la aspiración folicular



**Imagen 6:** Sedimento con ovocitos, una vez eliminando el sobrenadante

En cada una de las experiencias se hicieron 4 grupos de ovocitos:

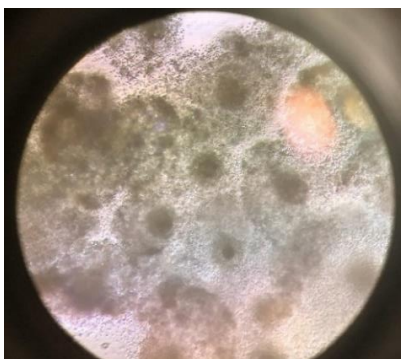
- Ovocitos para ser madurados *in vitro*, sin vitrificación (Control MIV)
- Ovocitos vitrificados control (Control vitrificación, R)
- Ovocitos vitrificados con ácido rosmarínico 105  $\mu\text{M}$  (R105)
- Ovocitos vitrificados con ácido rosmarínico 150  $\mu\text{M}$  (R150)

El sedimento de los tubos de ensayo se pasó a una placa petri, y en ella se procedió a la identificación y selección de los ovocitos con la ayuda de un estereomicroscopio o lupa. Puesto que en cada experiencia era necesario establecer 4 grupos de ovocitos, los ovocitos obtenidos se distribuían en un número similar para los 4 grupos. En cada caso, era necesario pasar los ovocitos por diferentes placas de lavado, para eliminar los restos de la aspiración innecesarios. Los ovocitos destinados a la maduración *in vitro*, tras un segundo y tercer lavado pasaban a los medios de maduración *in vitro*. El resto seguirían con el protocolo de vitrificación.

#### 4.2.3. Maduración *in vitro* (MIV) y valoración

El grupo de ovocitos control, pasaba al medio de maduración, donde permanecía durante 24h previo a su valoración. La maduración se llevaba a cabo en una estufa incubadora a 38,5°C, atmosfera saturada al 90% de humedad y un 5% de CO<sub>2</sub>. El resto de ovocitos inmaduros, se vitrificaban con los diferentes medios de vitrificación, con diferentes concentraciones de ácido rosmarínico (0 $\mu\text{M}$ , 105  $\mu\text{M}$  ó 150  $\mu\text{M}$ ).

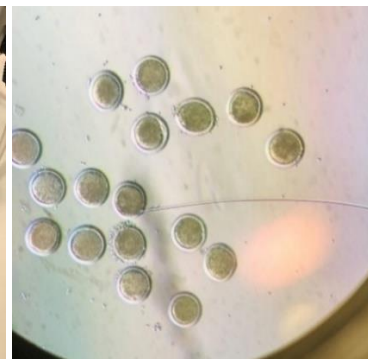
Pasadas las 24 horas el grupo de ovocitos control MIV, fueron evaluados (**Imagen 7**). Nos fijábamos en la expansión de las células del cúmulus para determinar su grado de maduración. Para constatarlo se valoraba también el estadio del núcleo, y para ello fue necesario realizar una tinción. Previo a la tinción era necesario llevar a cabo la denudación de los ovocitos, que se realizaba con un medio de denudación y la ayuda del vórtex (**Imagen 8**), donde permanecían durante 3 minutos (**Imagen 9**).



**Imagen 7:** Ovocitos control MIV con cúmulus expandido tras maduración



**Imagen 8:** Vórtex



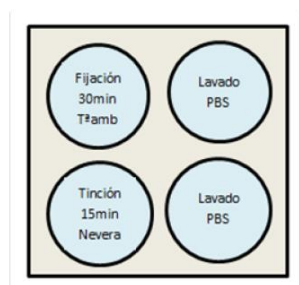
**Imagen 9:** Ovocitos control MIV tras vórtex

Una vez eliminadas las células del cúmulus se procedía a la tinción de los ovocitos control, utilizando la tinción Hoechst 33342. Tras la tinción pasaron a ser evaluados con un microscopio de fluorescencia, con el propósito de evaluar el aspecto general de los ovocitos, y sobre todo la fase nuclear en la que se encontraban.

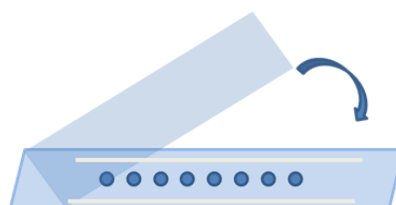
El protocolo que se siguió para la tinción fue el siguiente (**Figura 4**):

- Fijación: durante 30 minutos a Tª ambiente, los ovocitos permanecen en un pocillo con 500 µl de PBS y 10 µl glutaraldehído al 25%.
- Lavado: los ovocitos pasan por un pocillo con PBS previo a la tinción.
- Tinción: Los ovocitos permanecen 15 minutos a 4°C en un pocillo con 500 µl de solución colorante (5 ml PBS + 2 µl Hoechst stock).
- Lavado: finalmente los ovocitos se lavaron en PBS de nuevo.

Una vez lavados fueron dispuestos en un porta, sobre el cual se habían colocados varias microgotas son solución de montaje (6,25 ml glicerol + 6,25 ml PBS + 6,25 µl Hoechst) que los albergaron. A continuación, se colocaba un cubre por encima para poder visualizar los ovocitos en el microscopio (**Figura 5**).



**Figura 4:** Medios tinción Hoeschst 33342



**Figura 5:** Montaje de los ovocitos para su valoración

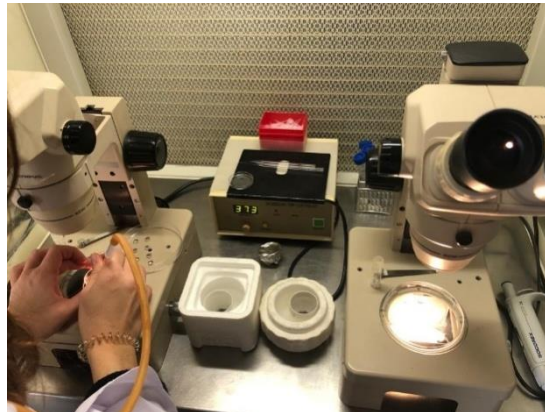
#### 4.2.4. Vitrificación de ovocitos inmaduros

La vitrificación se realizó siguiendo el protocolo de Sanae *et al.* (2018). Dentro de la vitrificación tendremos tres grupos diferentes de ovocitos:

- Grupo vitrificación control, sin ácido rosmarínico.
- Grupo de ovocitos vitrificados con ácido rosmarínico 105 µM.
- Grupo de ovocitos vitrificados con ácido rosmarínico 150 µM.

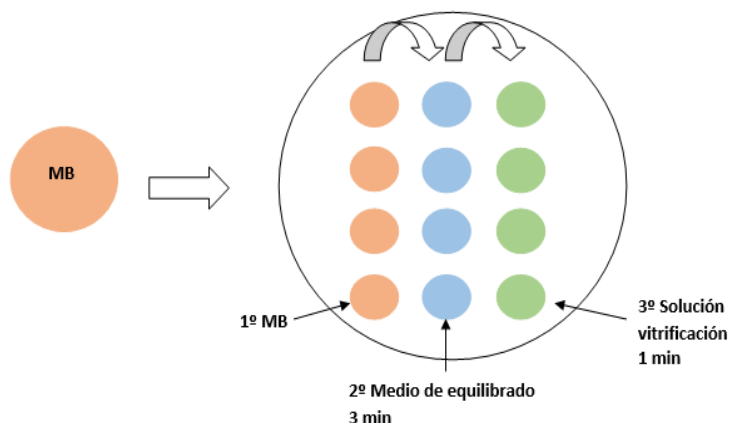
Los ovocitos primero fueron lavados con el medio base (MB) de vitrificación en una placa. Después pasarían al medio de equilibrado, donde estarían durante 3 minutos, para

posteriormente pasar al medio vitrificación (diferente según el grupo al que pertenezcan) donde permanecieron durante 1 minuto y de ahí pasar directamente al nitrógeno líquido (**Imagen 10**).



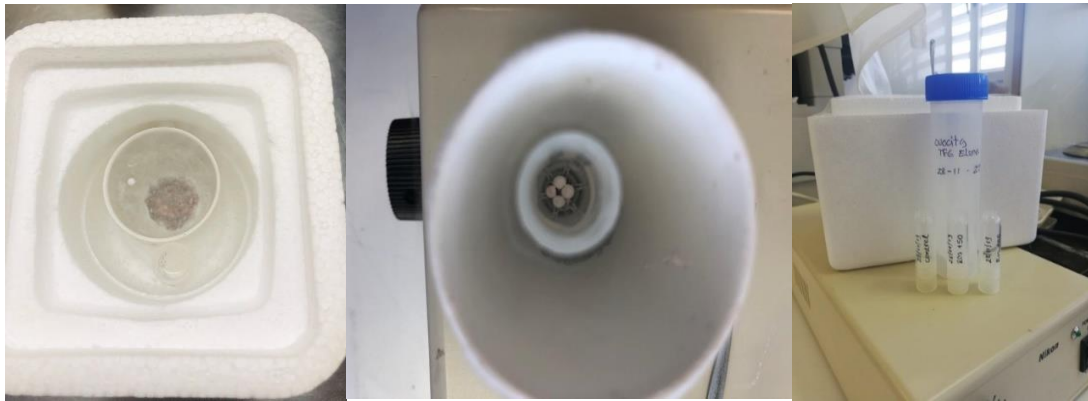
**Imagen 10:** Vitrificación ovocitos inmaduros

Para poder realizar todo este proceso con varios ovocitos a la vez, se prepararon sobre una placa de Petri y con la ayuda de una micropipeta varias líneas de trabajo, de forma que se colocaron cuatro gotas de medio base de forma vertical, paralelas a ellas, otras cuatro gotas con el medio de equilibrado y paralelas a estas, otras cuatro gotas con el medio de vitrificación. De esta forma los ovocitos, pasaron de un primer lavado con el medio base en una placa a la primera columna de la placa de Petri con medio base también, se colocaron 5 ovocitos en cada una de las cuatro gotas de MB. En el MB pueden permanecer sin límite, y sirve para prepararlos para el resto de medios por los que pasaran. Posteriormente se transfirieron a la siguiente columna de gotas de medio de equilibrado donde permanecieron durante 3 minutos, y a continuación se pasaron a la última columna de gotas, de medio de vitrificación, donde estuvieron durante 1 minuto. En cada una de las líneas se siguió este protocolo para los 5 ovocitos que iban a ser vitrificados (**Figura 6**).



**Figura 6:** Representación de los medios y soluciones usados en la etapa de vitrificación de ovocitos

Antes de la finalización del minuto en el medio de vitrificación, los ovocitos se tomaban con una micropipeta de 1-10  $\mu$ l, regulada en 10  $\mu$ l, y dicho volumen se dejaba caer directamente sobre el nitrógeno líquido (**Imagen 11**), sobre un colador de cerámica con el fondo oscuro (**Imagen 12**), lo cual facilitaba la recuperación de las esferas que se formaban, para su posterior almacenamiento en criotubos correctamente identificados con el protocolo seguido para los ovocitos que contenían la fecha de vitrificación (**Imagen 13**). Para facilitar el almacenaje y posterior manejo en el tanque de nitrógeno líquido, los criotubos se introducían en número de 3 en Falcon de 50ml (**Imagen 13**).



**Imagen 11:** Esfera de vitrificación.

**Imagen 12:** Formación de 4 esferas de vitrificación.

**Imagen 13:** Criotubos identificados.

#### 4.2.5. Desvitrificación de ovocitos y posterior maduración

Para la desvitrificación, usamos también el protocolo de Sanaeib y cols. (2018). Primero los ovocitos se pasaron a la solución de medio base de desvitrificación, para lavarlos y prepararlos para pasar a los diferentes medios de desvitrificación. Para la desvitrificación se usaron soluciones de trealosa de diferentes osmolaridades, pasando las muestras de concentraciones mayores a menores de trealosa con el fin de ir retirando su presencia de los medios. El primer lavado se realizó con una solución de trealosa 0,5 M, después se transfirieron a una solución de trealosa 0,25 M, y por último a se transfieren a la última solución de trealosa 0,125 M (**Imagen 14**). En cada una de las tres soluciones, los ovocitos permanecieron durante 3 minutos.



**Imagen 14:** Soluciones de trealosa para la desvitrificación.

Después de realizar el proceso de desvitrificación, los ovocitos pasaron a los medios de maduración descritos en el control. La maduración *in vitro* se llevó a cabo durante 24 horas en una estufa incubadora bajo las condiciones estándar de maduración, 38,5°C, atmosfera saturada al 90% de humedad y un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.6. Valoración de los ovocitos vitrificados

Transcurridas las 24 horas de maduración, nos fijaremos en la expansión de las células del cúmulus de los tres grupos de ovocitos y se procederá a la tinción de los mismos, para poder visualizar su núcleo y determinar el grado de maduración que habían alcanzado. El protocolo de tinción será el mismo que el que se ha descrito en la valoración de los ovocitos control MIV.

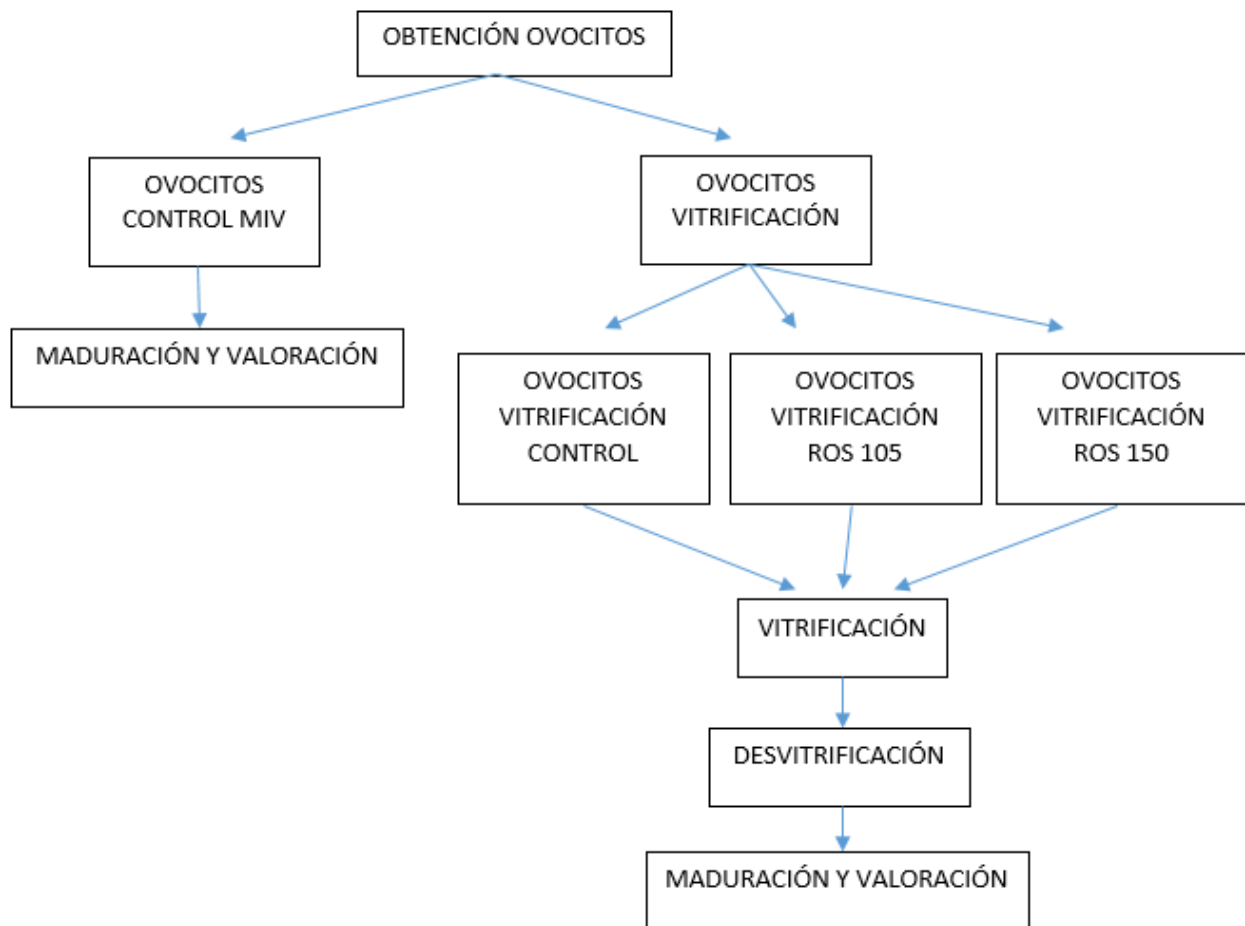
#### 4.2.7. Estudio estadístico

Todos los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SPSS, versión 22 para Windows. Los resultados obtenidos tras la maduración de los ovocitos fueron evaluados mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$ .

#### 4.2.8. Diseño experimental

El diseño experimental que se siguió para el desarrollo de todas las experiencias fue el siguiente (**Figura 7**).





**Figura 7:** Representación esquemática del procedimiento del trabajo experimental

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este estudio, se partió de un total de 381 ovarios de cordera, de los que se obtuvieron un total de 559 ovocitos (la tasa de recogida fue de 1,46 ovocitos por ovario) (**Tabla 5**).

**Tabla 5:** Ovocitos obtenidos y distribución en los diferentes grupos

	Nº DE OVARIOS	Nº DE OVOCITOS SELECCIONADOS	Nº DE OVOCITOS EN CADA GRUPO
<b>TOTAL</b>	351	559	-Ovocitos control MIV: 137 -Ovocitos vitrificación control: 136 -Ovocitos vitrificación Ros 105: 145 -Ovocitos vitrificación Ros 150: 141

En nuestro estudio, tras la desvitrificación y maduración se perdieron algunos ovocitos debido al propio manejo de los mismos: algunos se pudieron romper durante el proceso de denudado, o perderse en el paso por los diferentes medios de lavado o por quedarse pegados en las paredes de las pipetas. En concreto, se perdieron 61 ovocitos control MIV tras la maduración, 59 ovocitos

control vitrificación tras la maduración y vitrificación, 45 ovocitos del grupo de vitrificación Rosmarínico 105  $\mu$ M y 61 ovocitos del grupo vitrificación Rosmarínico 150 $\mu$ M.

Para llevar a cabo el experimental optamos por vitrificar ovocitos inmaduros. Son varios los estudios que trabajan con ovocitos inmaduros para la preservación, como por ejemplo Daddangadi *et al.* en 2020, quienes observaron que la integridad de los ovocitos es mejor cuando se vitrifica antes y no después de la maduración. Al vitrificar los ovocitos ya maduros vieron que aumentaba el número de husos meióticos anormales, se producían cambios en el patrón de distribución cortical y se reducía la tasa de fecundación. Aunque otros estudios como el de Borini y Bianchi, en 2010, determinan que la criopreservación de ovocitos inmaduros puede dar peores resultados debido por el daño directo inducido por el procedimiento de criopreservación o por la falta de coherencia con los protocolos de maduración.

Otro estudio como el de Canesin *et al.* en 2018, en el que vitrificaron ovocitos equinos inmaduros, obtuvieron una tasa de blastocisto del 15% después de la ICSI, viendo que los sistemas utilizados todavía mostraron un alto nivel de toxicidad y describiendo la necesidad de más trabajo en los métodos de vitrificación y calentamiento para aumentar la eficiencia de esta técnica. Appeltant, Somfai y Kikuchi, en 2018 investigaron los efectos de modificar varios factores sobre la viabilidad y el desarrollo de los ovocitos inmaduros porcinos después de la vitrificación, observando que algunos cambios como disminuir la exposición a la solución de vitrificación, equilibrar los ovocitos a temperatura ambiente (25 °C), utilizar el método de microgotas... mejoraban las tasas de supervivencia, establecieron así un sistema de criopreservación simplificado y definido para ovocitos inmaduros porcinos con mayor eficacia. En 2019, Ahmadi *et al.* evaluaron los efectos de la adición de ácido ascórbico (AA) y N-acetilcisteína (NAC) como antioxidantes y glicina como un agente orgánico al medio IVM tras la vitrificación / calentamiento de ovocitos ovinos inmaduros. Vieron que añadir NAC a la solución de maduración tras la vitrificación aumentaba las proporciones de ovocitos que alcanzaban la fase de metafase II y la tasa de producción de blastocistos.

Por el contrario, en el estudio de Sanaei *et al.* en 2018, donde vitrificaban ovocitos ovinos maduros, se obtuvo una alta tasa de ovocitos competentes para la fecundación y capaces de producir blastocistos de buena calidad con un índice apoptótico comparable al de los ovocitos frescos, al usar también concentraciones 0,5 M de trealosa que los protegían durante la misma y sin usar ninguna otra clase de antioxidante.

Estas variaciones en los resultados, puede atribuirse a las diferentes especies animales, al uso de diferentes protocolos de vitrificación y maduración utilizados y a los diferentes tipos y concentraciones de crioprotectores utilizados durante los procesos.

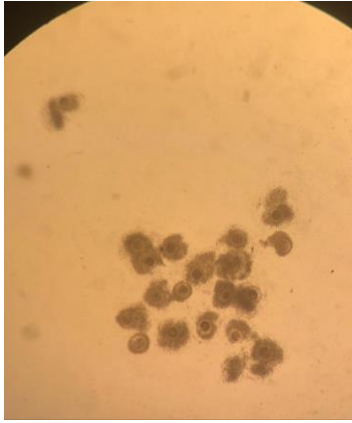
La presencia de las células del cúmulus también está sujeta a controversia. Una vez que los ovocitos fueron madurados, se observaron al microscopio para ver la expansión de las células del cúmulus y ver si se había producido bien la maduración. Para el proceso de vitrificación las células del cúmulus del ovocito que se encuentran a su alrededor no fueron eliminadas ya que en 2019 Rheem y Elsharkawy, vitrificaron ovocitos inmaduros con y sin células de cúmulus observando que después de la maduración *in vitro*, la tasa de ovocitos MII era mayor en el grupo de ovocitos vitrificados con las células del cúmulus presentes, aumentando por tanto la capacidad de supervivencia y la tasa de desarrollo. Otro estudio más adelante que apoyaba esta teoría fue el de Dos Santos-Neto *et al.* en 2020, donde realizaron un estudio en el que investigaron el efecto de preservar o no las células del cúmulus durante la vitrificación tanto en ovocitos maduros como inmaduros de corderas, observando que la vitrificación de los ovocitos con la presencia de las células del cúmulus mejoraba la criotolerancia y el desarrollo embrionario a la vez que aumentaba las tasas de formación de blastocisto.

Durante los procesos de vitrificación y desvitrificación se produce un incremento del stress oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno. Éstas producen la peroxidación lipídica que afecta a la estructura y función de la membrana plasmática de los ovocitos, a su fluidez y a su función (Freeman y Crapo, 1982). Además, puede producir alteración en el metabolismo y en la expresión génica (Dehghani *et al.*, 2019). Es por ello, que la inclusión de antioxidantes en medio de vitrificación puede mejorar la calidad y funcionalidad ovocitaria. En nuestro trabajo hemos incorporado dos concentraciones diferentes de ácido rosmarínico 105  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$  a las soluciones de vitrificación. Se usó este compuesto, debido a que en otros estudios como el de Borjizadeh *et al.* en 2019 determinaron que la adición de ácido rosmarínico (105  $\mu\text{mol/L}$ ) y ascórbico (0.5  $\text{mmol/L}$ ), o la combinación de ambos a la solución de vitrificación mejoraba la supervivencia, la maduración de las vesículas germinales, la tasa de fecundación y finalmente el desarrollo a la etapa de 4 células en ovocitos. Los resultados mostraron que la tasa de maduración de GV a ovocito MII, para el grupo en el que se usó ácido rosmarínico fue de un 71,50%, para el grupo con ácido ascórbico fue de un 75,36% y la combinación de ambos de un 82,35%, en comparación con el grupo control que obtuvo un 69,07%. Otro estudio que investigo los efectos del ácido rosmarínico fue el de Zhang *et al.* en 2019, que evaluó las influencias del ácido rosmarínico a diversas concentraciones (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ ) en la MIV de los ovocitos porcinos, obteniendo como resultados 5,46%, 7,95%, y 6,09% respectivamente, de tasa de formación de blastocisto, en comparación con el grupo control que obtuvo un 5,23%. Viendo así que el tratamiento con AR de 5  $\mu\text{M}$  durante el período de IVM de ovocitos porcinos era el que

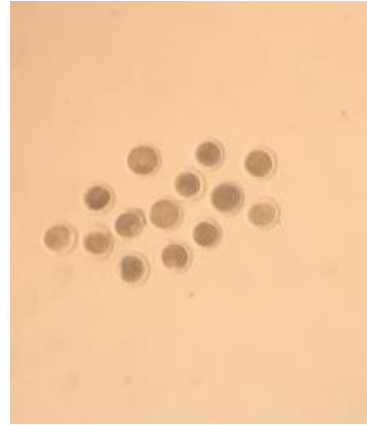
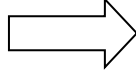
mejoraba la calidad de los blastocistos y la capacidad de eclosión después de la activación partenogenética, por lo que la presencia del ácido mejoraba drásticamente el número total de células después de la transferencia nuclear de células somáticas en comparación con el número de células en el grupo de control. Anteriormente, en 2014 Luño *et al.* también usaron este componente en un estudio para valorar el efecto del AR con diferentes concentraciones (0  $\mu\text{M}$ , 26,25  $\mu\text{M}$ , 52,5  $\mu\text{M}$  y 105  $\mu\text{M}$ ) sobre la calidad y capacidad de los espermatozoides de cerdo congelados y descongelados, donde confirmaron que la adición de AR al medio protegía la muestra contra el estrés oxidativo, comparándola con las muestras control sin dicha suplementación, ya que obtuvieron porcentajes de monospermia mayores cuando se fecundaban ovocitos con espermatozoides congelados con ácido rosmarínico (86,1%, 84,7%, 81,3% respectivamente) en comparación con el grupo control (80,2%), con tasas inferiores.

Una vez que observábamos la expansión de las células del cúmulus, pasábamos a su eliminación con el medio de denudación y la ayuda del vórtex para poder teñir los ovocitos y poder observarlos al microscopio de fluorescencia. Si estas células no son eliminadas dificultan la visualización del material nuclear del ovocito, ya que ellas también se tiñen con el mismo patrón con la tinción de Hoechst 33342 y nos impiden ver su núcleo correctamente.

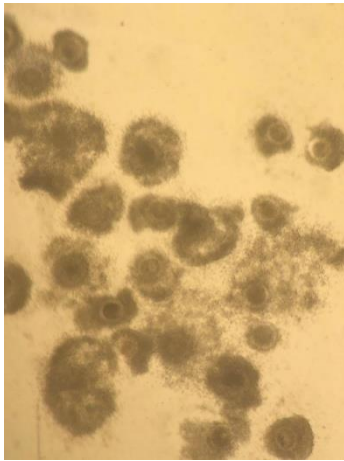
El grupo control MIV, en general las células del cúmulus se expandieron y se denudaron bien en todas las experiencias, a excepción de la segunda, que la expansión fue buena, pero necesitaron un 2º vórtex para denudarlos bien. En la última experiencia, en la que no hubo expansión del cúmulus, tras el vórtex apareció algún ovocito roto y varios con el citoplasma poco homogéneo, requirieron de pipeteo para terminar de denudar. Por otro lado, en los grupos de vitrificación por lo general todos se denudaron bien y la expansión de las células del cúmulus fue buena, en algún caso incluso se denudaron mejor los grupos con presencia de ácido rosmarínico en la vitrificación que el grupo control.



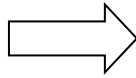
**Imagen 15:** Control vitrificación tras MIV.



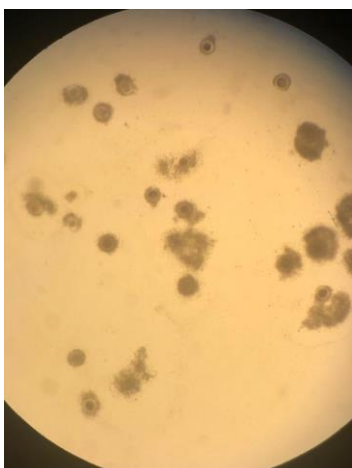
**Imagen 16:** Control vitrificación tras vórtex.



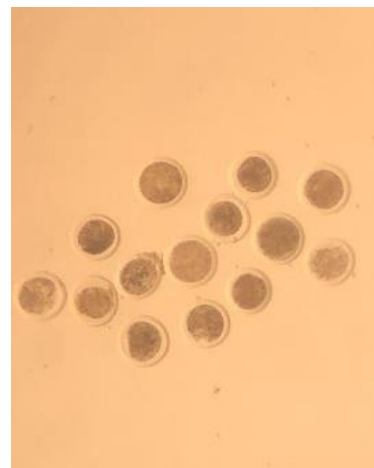
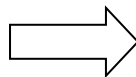
**Imagen 17:** Ros 105 tras MIV



**Imagen 18:** Ros 105 tras vórtex.



**Imagen 19:** Ros 150 tras MIV.



**Imagen 20:** Ros 150 tras vórtex.

Así tras la tinción, se realizó la valoración de los ovocitos, evaluando su núcleo y determinando el estadio nuclear en el que se encontraban. Ante la ausencia de estudios realizados sobre la

vitrificación suplementada con el antioxidante ácido rosmarínico en ovocitos de corderas, se nos presentó la necesidad de comparar y extrapolar los resultados obtenidos en nuestro estudio con los obtenidos en otros estudios de vitrificación de ovocitos de cordera pero con otro tipo de antioxidantes o con estudios en los que realizaron la vitrificación con el antioxidante ácido rosmarínico pero en ovocitos de otra especie diferente.

Se valoró su núcleo para determinar su estadio nuclear, cuantificando el porcentaje de ovocitos que habían llegado a Metafase II, es decir eran maduros. Así tras la valoración los ovocitos se encontraban en diferentes estadios de maduración, con los porcentajes indicados en la **Tabla 6**.

**Tabla 6:** Porcentaje de los estadios de maduración ovocitaria

Grupo	Nº ovocitos	Vesícula germinal n (%)	Metafase I n (%)	Metafase II n (%)	Degeneradosn (%)
Control	76	7 <sup>b</sup> (9,20)	15 <sup>b</sup> (19,70)	42 <sup>a</sup> (55,30)	11 <sup>b</sup> (18,50)
R0	77	13 <sup>b</sup> (16,90)	24 <sup>a</sup> (31,20)	24 <sup>b</sup> (31,20)	16 <sup>b</sup> (20,80)
R105	100	26 <sup>a</sup> (26,0)	29 <sup>a</sup> (29,0)	16 <sup>c</sup> (16,0)	29 <sup>a</sup> (29,0)
R150	80	18 <sup>a</sup> (22,50)	21 <sup>a</sup> (26,30)	16 <sup>c</sup> (20,0)	25 <sup>a</sup> (31,30)

Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

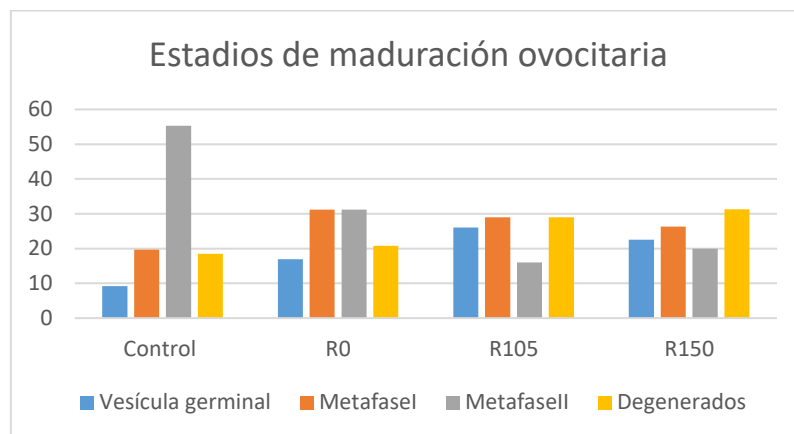
Se observa que el porcentaje de ovocitos en el estadio de Metafase II (**Imagen 21**) es significativamente menor en los grupos que se ha utilizado ácido rosmarínico ( $P < 0,05$ ), siendo en el grupo control, que no se vitrificó y solo se maduró en el que se encontraron los mejores resultados (55,30%), a diferencia del grupo que se vitrificó sin AR (31,20%), el grupo que se vitrificó con R105 (16,0%) y el grupo que se vitrificó con R150 (20,0%). Además, también se observó que el número de ovocitos degenerados aumentaba significativamente con el uso de ácido rosmarínico ( $P < 0,05$ ) (**Gráfica 1**). Es lógico encontrar mejores resultados en el grupo control, ya que los procesos de vitrificación producen en las células daños a nivel mecánico, osmótico y oxidativo, por lo que la supervivencia y competencia de los mismos es siempre menor (Borjizadeh *et al.*, 2019). No obstante, la tasa de degenerados no muestra diferencias significativas entre el grupo control y el grupo R0 vitrificado, por lo que la incorporación a los medios de vitrificación de 0,5M de trealosa ejerce un efecto protector y beneficioso en los ovocitos ovinos prepúberes. Este efecto ya ha sido descrito anteriormente en otros estudios como el de Sanaei *et al.* en 2018 , donde se usaron concentraciones de 0, 0,25, 0,5 y 1,0 M de trealosa, obteniendo los siguientes resultados de supervivencia de ovocitos, 46,89%, 70,76%,

92,82%, y 68,22% respectivamente, y observando así que la concentración de trealosa 0,5M era la que mejores efectos producía sobre los ovocitos.



**Imagen 21:** Ovocitos en metafase II

**Gráfica 1:** Estadios de maduración ovocitaria



Estos datos difieren de los obtenidos por Borjizadeh *et al.* en 2019, que en su caso el uso de ácido rosmarínico (105µmol/L) en la solución de vitrificación para ovocitos de ratón sí que mejoró los resultados de maduración de ovocitos inmaduros, la tasa de fecundación y finalmente el desarrollo a la etapa de 4 células. Su grupo control tuvo un 69,07% ovocitos en metafase II, y su grupo de vitrificación con AR un 71,50%.

Otros estudios en los que usaron otro antioxidante para la vitrificación de ovocitos inmaduros ovinos fueron, el estudio de Ahmadi *et al.* en 2019, que usaron ácido ascórbico (AA) y Nacetil cisteína (NAC) como antioxidantes, los cuales redujeron la proporción de ovocitos apoptóticos y embriones fragmentados, lo que se reflejó como un aumento en las proporciones de la producción de ovocitos en metafase II y blastocistos. Su grupo control obtuvo un 29,9% de ovocitos en metafase II frente a los grupos suplementados con ácido ascórbico (58,7%) y Nacetil cisteína (59,0).

dos Santos Morais *et al.* en 2019 evaluó el efecto de la adición de antioxidantes anetol (AN) y robinina (RO) en la solución de vitrificación de ovocitos ovinos. Usando diferentes concentraciones de AN (30, 300 y 2000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) o RO (0,125, 0,25 y 0,50  $\text{mg} / \text{ml}$ ). Concluyeron que el uso de estos antioxidantes es beneficioso para la solución de vitrificación del tejido ovárico ovino, observando que las concentraciones AN 2000 o RO 0,125, reducían los niveles de ROS y mantenían la actividad mitocondrial sin cambios. Apuntaron que es necesario definir las concentraciones ideales, ya que con otras concentraciones estas mejorías no eran tan notorias. Otro estudio en el que se usaron diferentes antioxidantes para la vitrificación de ovocitos de corderas, fue el estudio de Sudiman *et al.* en 2019, que comparó los resultados de las corderas con los de ratón, observando que según la especie se mostraban diferentes tolerancias a los efectos citotóxicos de los crioprotectores utilizados en el procedimiento de vitrificación. Destacaron una alta sensibilidad de los ovocitos de cordera a las lesiones por frío y a la toxicidad crioprotectora durante la vitrificación, por lo que las combinaciones de crioprotectores tienen que ser cuidadosamente seleccionadas para la especie para así optimizar las tasas de éxito y la supervivencia y desarrollo del embrión. Debido a ello en el presente estudio, los resultados han podido verse empeorados debido a la sensibilidad de los ovocitos de corderas, quedando para futuras investigaciones el estudio de las concentraciones óptimas para esta especie.



## 6. CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos durante el estudio podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- La adición de ácido rosmarínico sobre los medios de vitrificación de ovocitos ovinos no supone una mayor protección de los mismos en dicho proceso de preservación.
- La posible causa de este resultado podría ser una concentración inadecuada de ácido rosmarínico.
- Es necesario el estudio de las concentraciones óptimas de ácido rosmarínico para esta especie, puesto que consideramos que puede ofrecer una correcta protección frente a los daños que sufren los ovocitos en la vitrificación.

## CONCLUSIONS

With the analysis of the results obtained during this study, we can reach the following conclusions:

- The addition of rosmarinic acid to the vitrification media of sheep oocytes does not suppose a greater protection of the same in said preservation process.
- The possible cause of this result could be an inadequate concentration of rosmarinic acid.
- It is necessary to study the optimal concentrations of rosmarinic acid for this species, since we consider that it can offer correct protection against the damage suffered by oocytes in vitrification.

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo me ha resultado muy útil, ya que se me ha dado la oportunidad de hacer un estudio experimental dentro de un departamento, profundizando en un campo específico que me gusta, como es el de la reproducción animal y al que me gustaría dedicarme en un futuro. Me ha permitido adquirir nuevos conocimientos, a la vez que desarrollar habilidades para la búsqueda de bibliografía científica, y aumentar mi destreza en el uso de equipos y utensilios de laboratorio.

Llegado el final de este trabajo, quiero expresar mis agradecimientos a mis tutoras Noelia González Ortí y Victoria Luño Lázaro por su apoyo, consejos, dedicación y ayuda a lo largo de todos estos meses de realización del trabajo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadi, E. et al. (2019) 'Antioxidants and glycine can improve the developmental competence of vitrified/warmed ovine immature oocytes', *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), pp. 595–603. doi: 10.1111/rda.13402.
- Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M. and Sen, P. (1999) 'Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials', *Indian Journal of Experimental Biology*. National Institute of Science Communication, pp. 124–130.
- Albarracín Monje, J. L. and Mogas Amorós, T. (2005) 'Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Straw'. Available at: <http://ddd.uab.cat/record/36503>.
- Appeltant, R., Somfai, T. and Kikuchi, K. (2018) 'Faster, cheaper, defined and efficient vitrification for immature porcine oocytes through modification of exposure time, macromolecule source and temperature', *Cryobiology*. Elsevier Inc., 85, pp. 87–94. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.09.004.
- Arav, A. (2014) 'Cryopreservation of oocytes and embryos', *Theriogenology*, pp. 96–102. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.011.
- Berlinguer, F. et al. (2007) 'Effects of trehalose co-incubation on in vitro matured prepubertal ovine oocyte vitrification', *Cryobiology*, 55(1), pp. 27–34. doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.04.004.
- Borini, A. and Bianchi, V. (2010) 'Cryopreservation of mature and immature oocytes', *Clinical Obstetrics and Gynecology*, pp. 763–774. doi: 10.1097/GRF.0b013e3181f96f01.
- Borjizadeh, A. et al. (2019) 'The effect of adding Rosmarinic and Ascorbic acids to vitrification media on fertilization rate of the mice oocyte: An experimental study', *International Journal of Reproductive BioMedicine*. Knowledge E, 17(3). doi: 10.18502/ijrm.v17i3.4518.
- Cai, H. et al. (2018) 'Open versus closed vitrification system of human oocytes and embryos: A systematic review and meta-analysis of embryologic and clinical outcomes', *Reproductive Biology and Endocrinology*. BioMed Central Ltd. doi: 10.1186/s12958-018-0440-0.
- Canesin, H. S. et al. (2018) 'Vitrification of germinal-vesicle stage equine oocytes: Effect of cryoprotectant exposure time on in-vitro embryo production', *Cryobiology*, 81(January), pp. 185–191. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.01.001.
- Cano Torres, R. (2009) 'Vitrificación de ovocitos (inmaduros y maduros) y embriones ovinos producidos in vitro: comparación de las técnicas ops y ops modificada (mops)'. Universidad de Zaragoza, p. 1.

- Carroll, J., Wood, M. J. and Whittingham, D. G. (1993) 'Normal Fertilization and Development of Frozen-Thawed Mouse Oocytes: Protective Action of Certain Macromolecules<sup>1</sup>', *Biology of Reproduction*, 48(3), pp. 606–612. doi: 10.1095/biolreprod48.3.606.
- Castillo-Martí, M. et al. (2013) 'Cryotolerance of in vitro produced porcine blastocysts is improved when using glucose instead of pyruvate and lactate during the first 2 days of embryo culture'. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(5), pp. 737-745. doi: 10.1071/RD12117.
- Chinen, S. et al. (2020) 'Rescue of vitrified-warmed bovine mature oocytes by short-term recovery culture with resveratrol', *Cryobiology*. Academic Press Inc. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.03.004.
- Comporti, M. (1989) 'Three models of free radical-induced cell injury', *Chemico-Biological Interactions*, pp. 1–56. doi: 10.1016/0009-2797(89)90016-1.
- Critser, J. K., Agca, Y. and Gunasena, K. T. (1997) 'The Cryobiology of Mammalian Oocytes', *Reproductive Tissue Banking*, pp. 329–357. doi: 10.1016/b978-012399770-8/50008-3.
- Daddangadi, A. et al. (2020) 'Germinal stage vitrification is superior to MII stage vitrification in prepubertal mouse oocytes', *Cryobiology*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.02.012.
- Dehghani, N. et al. (2019) 'Overexpression of mitochondrial genes (Mitochondrial transcription factor A and cytochrome c oxidase subunit 1) in mouse metaphase ii oocytes following vitrification via cryotop', *Iranian Journal of Medical Sciences*, 44(5), pp. 406–414. doi: 10.30476/ijms.2019.44960.
- Desai, N., Ludgin, J., Sharma, R., Anirudh, R. K., & Agarwal, A. (2017). Female and male gametogenesis. In *Clinical reproductive medicine and surgery* (pp. 19-45). Springer, Cham.
- Diaz Corujo, A. R. (2007) 'Vitrificación de ovocitos ovinos: valoración ultraestructural y citofisiológica'. Universidad de León, p. 1.
- Dinara, S. et al. (2001) 'Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes', *Human Reproduction*, 16(9), pp. 1976–1981. doi: 10.1093/humrep/16.9.1976.
- Freeman, B. A. and Crapo, J. D. (1982) 'Biology of disease. Free radicals and tissue injury', *Laboratory Investigation*, pp. 412–426.
- Gilchrist, R. B., Lane, M. and Thompson, J. G. (2008) 'Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality', *Human Reproduction Update*, 14(2), pp. 159–177. doi:

10.1093/humupd/dmm040.

Hochi, S. et al. (1998) 'Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes', *Theriogenology*, 49(4), pp. 787–796. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00028-4.

Holt, Wv. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction* (62), pp. 3-22.

Hong, J. Y. et al. (2004) 'Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media', *Theriogenology*, 62(8), pp. 1473–1482. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.02.013.

Labrune, E. et al. (2020) 'Cellular and molecular impact of vitrification versus slow freezing on ovarian tissue', *Tissue Engineering Part C: Methods*, 33(0), pp. 1–33. doi: 10.1089/ten.tec.2020.0063.

Lane, M. (2002) 'Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development', *Human Reproduction*, 17(10), pp. 2686–2693. doi: 10.1093/humrep/17.10.2686.

Luño, V. et al. (2014) 'Rosmarinic acid improves function and in vitro fertilising ability of boar sperm after cryopreservation', *Cryobiology*. Academic Press Inc., 69(1), pp. 157–162. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.07.002.

Luvoni, G. C. and Colombo, M. (2020) 'Cold case: Small animal gametes cryobanking', *Theriogenology*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.047.

Ma, Q. (2010) 'Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier B.V., 125(3), pp. 376–393. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.11.004.

Massip, A.; Van der Zwalm, P.; Scheffen, B.; Ectors, F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo letter*, 7:270-273.

Martino, A., Pollard, J. W. and Leibo, S. P. (1996) 'Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence', *Molecular Reproduction and Development*, 45(4), pp. 503–512. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<503::AID-MRD13>3.0.CO;2-X.

Mazur, P. (1984) 'Freezing of living cells: mechanisms and implications.', *The American journal of physiology*, 247(3 Pt 1), pp. 0–4. doi: 10.1152/ajpcell.1984.247.3.c125.

Moawad, A. R. et al. (2013) 'l-Carnitine Supplementation During Vitrification of Mouse Oocytes at the Germinal Vesicle Stage Improves Preimplantation Development Following Maturation and Fertilization In Vitro', *Biology of Reproduction*, 88(4), pp. 1–8. doi:

10.1095/biolreprod.112.107433.

Moawad, A. R. et al. (2014) 'L-Carnitine supplementation during vitrification of mouse germinal vesicle stage-oocytes and their subsequent in vitro maturation improves meiotic spindle configuration and mitochondrial distribution in metaphase II oocytes', *Human Reproduction*, 29(10), pp. 2256–2268. doi: 10.1093/humrep/deu201.

Moore, Al., Squires, EL. y Bruemmer, JE. (2006). Effects of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* (26), pp. 215-218.

Moussa, M. et al. (2014) 'Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Current problems and future perspectives', *Science China Life Sciences*. Science in China Press, pp. 903–914. doi: 10.1007/s11427-014-4689-z.

Murray, A. A. et al. (2001) 'Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro', *Reproduction. Journals of Reproduction and Fertility Ltd*, 121(1), pp. 89–96. doi: 10.1530/rep.0.1210089.

Odani, M. et al. (2003) 'Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray', *Cryobiology*, 47(2), pp. 155–164. doi: 10.1016/j.cryobiol.2003.09.001.

Parkening, T. A., Tsunoda, Y. and Chang, M. C. (1976) 'Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs', *Journal of Experimental Zoology*, 197(3), pp. 369–374. doi: 10.1002/jez.1401970310.

Pujol, A. et al. (2019) 'Comparison of two different oocyte vitrification methods: A prospective, paired study on the same genetic background and stimulation protocol', *Human Reproduction*, 34(6), pp. 989–997. doi: 10.1093/humrep/dez045.

Quan, G., Wu, G. and Hong, Q. (2017) 'Oocyte Cryopreservation Based in Sheep: The Current Status and Future Perspective', *Biopreservation and Biobanking*, 15(6), pp. 535–547. doi: 10.1089/bio.2017.0074.

Rheem, S. M. A.-E. and Elsharkawy, S. (2019) 'Effect of Cumulus Cells on the Efficiency of Vitrified-Thawed Immature Cattle Oocytes', *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, 09(05), pp. 669–678. doi: 10.4236/ojog.2019.95066.

Sanaei, B. et al. (2018) 'Developmental competence of in vitro matured ovine oocytes vitrified in solutions with different concentrations of trehalose', *Reproduction in Domestic Animals*, 53(5), pp. 1159–1167. doi: 10.1111/rda.13221.

Schiewe, M.C.; Rall, W.F.; Stuart, L.D.; Wildt, D.E. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*, 36:279-293

Serra, E. et al. (2020) 'Morphological features and microtubular changes in vitrified ovine oocytes', *Theriogenology*. Elsevier Ltd, 148(xxxx), pp. 216–224. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.007.

dos Santos Morais, M. L. G. et al. (2019) 'Natural antioxidants in the vitrification solution improve the ovine ovarian tissue preservation', *Reproductive Biology*, 19(3), pp. 270–278. doi: 10.1016/j.repbio.2019.07.008.

Shaw, J. M., Ward, C. and Trounson, A. O. (1995) 'Fertilization and early embryology: Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos', *Human Reproduction*, 10(2), pp. 396–402. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a135951.

Son, W. Y. et al. (2019) 'Immature oocyte for fertility preservation', *Frontiers in Endocrinology*, 10(JULY), pp. 1–11. doi: 10.3389/fendo.2019.00464.

Sudiman, J. et al. (2019) 'Tolerance of lamb and mouse oocytes to cryoprotectants during vitrification', *Zygote*, 27(1), pp. 25–35. doi: 10.1017/S0967199418000606.

Tarin JJ, Trounson AO. Effects of stimulation or inhibition of lipid peroxidation on freezing thawing of mouse embryos. *Biol Reprod* 1993;49:1362–1368.

Truong, T. T. and Gardner, D. K. (2020) 'Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification', *Human Reproduction*, 35(1), pp. 12–23. doi: 10.1093/humrep/dez243.

Truong, T. T., Soh, Y. M. and Gardner, D. K. (2016) 'Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability', *Human Reproduction*, 31(7), pp. 1445–1454. doi: 10.1093/humrep/dew098.

Vajta, G. (2020) 'Vitrification in ART: past, present, and future', *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.057.

Vajta, G., Rienzi, L. and Ubaldi, F. M. (2015) 'Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos', *Reproductive BioMedicine Online*. Reproductive Healthcare Ltd., 30(4), pp. 325–333. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.12.012.

Whittingham, D.G.; Wood, M.; Farrant, J.; Lee, H.; Halsey, J.A. 1979. Survival of frozen mouse

embryos after rapid thawing from -196 degrees C. Journal of Reproduction and Fertility. 56:11-21.

Yuswiati, E.; Holtz, W. 1990. Successful transfer of vitrified goat embryos. Theriogenology, 34:629-632.

Zhang, Y. et al. (2019) 'Rosmarinic acid treatment during porcine oocyte maturation attenuates oxidative stress and improves subsequent embryo development in vitro', PeerJ, 2019(6), pp. 1–15. doi: 10.7717/peerj.6930.

## 9. ANEXOS: INDICE DE FIGURAS, IMÁGENES, GRÁFICAS Y TABLAS

### FIGURAS:

Figura 1: Pasos en congelación lenta tradicional y vitrificación.....	5
Figura 2: Formación de cristales durante la congelación.....	6
Figura 3: Movimiento de los diferentes tipos de crioprotectores y del agua durante los procesos de vitrificación y desvitrificación.....	12
Figura 4: Medios tinción Hoeschst 33342.....	20
Figura 5: Montaje de los ovocitos para su valoración.....	20
Figura 6: Representación de los medios y soluciones usados en la etapa de vitrificación de ovocitos.....	21
Figura 7: Representación esquemática del procedimiento del trabajo experimental.....	24

### IMÁGENES:

Imagen 1: Ovocitos de cordera.....	4
Imagen 2: Ovarios de cordera.....	16
Imagen 3: Recipiente isoterma para el transporte de los ovarios (30°C).....	18
Imagen 4: Ovarios en baño maría a 30°C .....	18
Imagen 5: Tubos de ensayo con el resultado de la aspiración folicular.....	18
Imagen 6: Sedimento con ovocitos, una vez eliminando el sobrenadante .....	18
Imagen 7: Ovocitos control MIV con cúmulus expandido tras maduración.....	19
Imagen 8: Vórtex.....	19
Imagen 9: Ovocitos control MIV tras vórtex.....	19
Imagen 10: Vitrificación ovocitos inmaduros.....	21
Imagen 11: Esfera de vitrificación.....	22
Imagen 12: Formación de 4 esferas de vitrificación.....	22

Imagen 13: Criotubos identificados.....	22
Imagen 14: Soluciones de trehalosa para la desvitrificación.....	23
Imagen 15: Control vitrificación tras MIV.....	28
Imagen 16: Control vitrificación tras vórtex.....	28
Imagen 17: Ros 105 tras MIV.....	28
Imagen 18: Ros 105 tras vórtex.....	28
Imagen 19: Ros 150 tras MIV.....	28
Imagen 20: Ros 150 tras vórtex.....	28
Imagen 21: Ovocitos en metafase II.....	30

**GRÁFICA:**

Gráfica 1: Estadios de maduración ovocitaria.....	30
---	----

**TABLAS:**

Tabla 1: vitrificación vs congelación lenta tradicional.....	7
Tabla 2: Tasas de supervivencia, escisión y blastocisto de ovocitos de oveja, usando diferentes combinaciones de crioprotectores.....	8
Tabla 3: Medios para la obtención y preparación de ovocitos.....	16
Tabla 4: Medios utilizados en la vitrificación y desvitrificación.....	17
Tabla 5: Ovocitos obtenidos y distribución en los diferentes grupos.....	24
Tabla 6: Porcentaje de los estadios de maduración ovocitaria.....	29