

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**VITRIFICACIÓN Y TRASPLANTE DE OVARIOS DE RATÓN**

Por

Fabiana ISAURRALDE SILVA

TESIS DE GRADO presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de Doctor en  
Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, inspección, control y  
tecnología de los alimentos de origen animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

**TESIS DE GRADO APROBADA POR:**

**Presidente de mesa:**

---

**Segundo Miembro (Tutor):**

---

**Dr. Daniel Elhordoy**

**Tercer Miembro:**

---

**Co-Tutor:**

---

**Dra. Silvia Hernández**

**FECHA:**

---

**AUTORES:**

---

**Fabiana Isaurralde**

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Centro Uruguayo de Imagenología Molecular por abrirme sus puertas y darme la posibilidad y los recursos necesarios para realizar este trabajo, especialmente al Dr. Eduardo Savio responsable del área de desarrollo biomédico.
- A mi co-tutora Dra. Silvia Hernández quien ha sabido guiarme, acompañarme y brindar todos sus conocimientos, dedicación y generosidad para que este trabajo sea posible.
- A mi tutor Dr. Daniel Elhordoy por su buena predisposición y dedicación.
- A mis padres quienes me inculcaron lo importante que es forjar mi futuro estudiando, y junto con mi abuela y hermana me apoyaron incondicionalmente en este camino recorrido.
- A Luigi, por su amor y apoyo incondicional, quien supo acompañarme y entenderme siempre.
- A Estefania y Silvina quienes con todo su cariño me aconsejaron y brindaron su apoyo.
- Gracias a todas y cada una de las personas que en menor o mayor medida me han acompañado, sin ustedes no hubiera sido posible.

A todos, Muchas gracias.

## RESUMEN

El desarrollo de la ciencia de animales de laboratorio y de la ingeniería genética ha permitido la generación de un creciente número de líneas de ratones y modelos genéticamente modificados. Estos avances han determinado un aumento cuantitativo en el espacio de las instalaciones de animales de laboratorio y un riesgo creciente de perder los valiosos modelos que se van generando. Las técnicas reproductivas permiten el mantenimiento, conservación, transporte y evita los impedimentos éticos que dificultan la permanencia de animales vivos. La aplicación del trasplante de ovario ha sido reportado en varias líneas pero en modelos genéticamente modificados existen pocos estudios. El objetivo de esta investigación fue poner a punto la técnica de trasplante y vitrificación de ovario en un modelo genéticamente modificado, para contribuir a formar un banco genético. Las donadoras de ovarios fueron 20 hembras triple transgénicas, modelo para Enfermedad de Alzheimer < de 10 días de edad. 16 ovarios fueron trasplantados en fresco y 20 ovarios fueron vitrificados para su posterior trasplante. Las receptoras correspondieron al fondo genético de la línea transgénica de 8 a 9 semanas de edad. Se dividieron en 2 grupos al azar, 8 recibieron trasplante de ovarios frescos y 10 vitrificados. Para la cirugía la anestesia administrada fue una combinación de xilacina/acepromacina/ketamina. A los 7 días post cirugía se realizó colpocitología vaginal para determinar actividad ovárica; repitiendo a los 15 y 21 días. Las hembras que presentaron actividad ovárica fueron servidas con machos de la línea triple transgénica. Las hembras que no quedaron preñadas en un plazo de 16 semanas y las que fueron trasplantadas con éxito al final del protocolo fueron sacrificadas por dislocación cervical para la observación de los ovarios y evaluación del trasplante. Se describen: i) las modificaciones realizadas a la técnica quirúrgica; ii) los resultados de las colpocitologías post cirugía; iii) los parámetros reproductivos y iv) los resultados de los análisis genéticos de la descendencia. La actividad ovárica se observó entre 7 y 15 días post cirugía. La tasa de preñez fue de 87,5% en las receptoras de ovarios frescos y 60,0% en ovarios vitrificados. El promedio de días a la 1er camada fue de 38 y 42 en receptoras de ovarios frescos y vitrificados respectivamente. El promedio de crías por camada en las trasplantadas con ovarios frescos fue 4 y 6 en las de ovarios vitrificados. El intervalo de días entre camadas en promedio fue 28 y 34. Todos los parámetros reproductivos no dieron diferencias estadísticamente significativas. Solo las receptoras trasplantadas con ovarios frescos tuvieron descendencia genéticamente modificada. Esta técnica es una herramienta sencilla y de bajo costo para la creación de bancos genéticos que complementa la criopreservación de espermatozoides y el trasplante de embriones. Su aplicación en líneas genéticamente modificadas requiere mayores estudios ya que los resultados dependen de las modificaciones y de los fondos genéticos además del protocolo de elección.

## SUMMARY

The development of laboratory animal science and genetic engineering has allowed the generation of a growing number of genetically modified animal models. These advances create a quantitative increase in the space of laboratory animal facilities and an increasing risk of losing the valuable models that are generated. The implementation of reproductive techniques allows the maintenance, conservation, transport and avoids the ethical impediments that hinder the permanence of live animals. The application of ovarian transplantation has been reported in several lines but there are few studies in genetically modified models. The objective of this research was to develop the technique of ovarian transplantation and vitrification in order to contribute to form a genetic bank. The ovarian donors were 20 triple transgenic females mice, which are considered a model for Alzheimer's disease <10 days old. 16 ovaries were fresh transplanted and 20 ovaries were vitrified according to the technique described by Nakagata, 2015 for subsequent transplantation. The recipients corresponded to the genetic background of the transgenic line of 8 to 9 weeks old. They were divided into 2 random groups: 8 received fresh ovarian transplantation and 10 vitrified ones. The surgery was performed according to the technique described by Jones and Krohn in 1960, with some modifications. The anesthesia administered was a combination of xylazine/ acepromazine /ketamine. Ovarian function was monitored by vaginal cytology 7 days after transplantation; repeating at 15 and 21 days. Females who had ovarian activity were co-housed with triple transgenic males. Females that did not delivered any litter after breeding for 16 weeks and those who were successfully transplanted at the end of the protocol were sacrificed by cervical dislocation for observation of the ovary and transplant evaluation. In this study it is reported: i) the modifications of the surgical technique, ii) the results of the vaginal cytology after surgery, iii) the reproductive parameters and iv) the results of the genetic analyzes of the offspring. Ovarian activity was observed between 7 and 15 days after transplantation. The pregnancy rate was 87.5% in recipients of fresh ovaries and 60.0% in those with vitrified ovaries. The average number of days at the 1st litter was 38 vs 42, in the fresh ovaries recipients and with vitrified ovaries respectively. The average litter size in females transplanted with fresh ovaries was 4 and 6 in those with vitrified ones. The average range of days between litters was 28 and 34. Reproductive parameters did not show statistically significant differences. Only recipients transplanted with fresh ovaries delivered genetically modified offspring. This technique is a simple and low-cost tool for the creation of genetic banks that complements sperm cryopreservation and embryo transplantation. Its application in genetically modified lines requires further studies since the results depend on the modifications and genetic funds, in addition to the protocol of choice.

## **TABLA DE CONTENIDO**

|  |    |
|--|----|
| Página de Aprobación .....   | 1  |
| Agradecimientos .....  | 2  |
| Resumen .....  | 3  |
| Summary .....  | 4  |
| Introducción .....   | 7  |
| Revisión Bibliográfica .....   | 11 |
| El animal de laboratorio .....   | 11 |
| Características reproductivas de la hembra de ratón de laboratorio ..... | 14 |
| Anatomía del aparato reproductor .....                                   | 14 |
| Fisiología del aparato reproductor .....                                 | 16 |
| Ciclo estral .....   | 19 |
| Control neuroendócrino del ciclo estral .....                            | 19 |
| Factores que afectan el ciclo estral .....                               | 20 |
| Etapas del ciclo estral .....  | 21 |
| Cópula y Fertilización .....   | 23 |
| Pseudopreñez .....   | 24 |
| Gestación .....  | 25 |
| Detección de la preñez .....   | 25 |
| Parto y Lactación .....  | 26 |
| Senescencia .....  | 27 |
| Criopreservación .....   | 28 |
| Tipos de congelación .....   | 29 |
| Trasplante de ovario y vitrificación .....                               | 33 |
| Antecedentes .....   | 33 |
| Trasplante de ovario-características .....                               | 34 |
| Criopreservación de ovario- características .....                        | 36 |
| Validación del ovario criopreservado .....                               | 36 |
| Objetivos .....  | 37 |
| Objetivo general .....   | 37 |
| Objetivos Específicos .....  | 37 |

|   |    |
|---|----|
| Materiales y métodos .....  | 37 |
| Prueba Piloto .....   | 38 |
| Animales .....  | 39 |
| Extracción de ovarios del donante .....   | 40 |
| Protocolo de vitrificación y descongelación de ovarios .....                            | 40 |
| Procedimiento de trasplante de ovario .....   | 41 |
| Determinación de la ciclicidad, apareamiento y evaluación de la preñez .....            | 41 |
| Identificación de la presencia de los transgenes APP, Tau y<br>mutaciones en Psen ..... | 42 |
| Análisis de los datos .....   | 42 |
| Resultados .....  | 43 |
| Discusión .....   | 48 |
| Conclusiones .....  | 51 |
| Bibliografía .....  | 52 |

## 1. INTRODUCCIÓN

Históricamente los estudios con animales han sido fundamentales para conocer, prevenir y curar las enfermedades humanas y animales. Han contribuido con la salud, la calidad de vida y prolongación de la esperanza de vida. Estos logros no hubiesen sido posibles sin los conocimientos adquiridos por el uso de animales en investigación. Además, los estudios con animales son un requisito previo para poder autorizar ensayos clínicos en humanos y predecir la eficacia de los medicamentos, a fin de proteger la salud y el medio ambiente (Zuñiga y Orellana, 2016).

En la actualidad existe un compromiso real para desarrollar métodos alternativos que sustituyan al uso de animales. Reemplazar en el ámbito del animal de laboratorio supone sustituir la utilización de animales por otros métodos que no impliquen su uso o, en su defecto, introducir nuevos diseños experimentales que permitan reducir su número. El desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal ha tenido un gran avance principalmente en el sector de la valoración toxicológica de fármacos y productos químicos (Doke y Dahawale, 2015).

Los métodos alternativos se basan principalmente en cultivos celulares o de tejidos, tales como tejidos humanos en tres dimensiones y miniórganos reconstituidos. También se han desarrollado herramientas bioinformáticas y el uso de datos masivos que se usan sobre todo a la hora de evaluar la toxicidad de un producto farmacológico (Balls, 2002; Ranganatha y Kuppast, 2012).

Si bien el desarrollo de estos métodos ha reducido notoriamente el uso de animales, aún siguen siendo, en muchos casos insustituibles.

En 2016 cifras aportadas por la Unión Británica para la Abolición de la Vivisección y el Consejo en Bioética Nuffield del Reino Unido afirmaron que el uso de animales asciende hasta 100 millones de vertebrados en todo el planeta, el 10% de los cuales se usaron en la Unión Europea. En España entre el 2009 y el 2017 el uso se redujo en 43% (datos del gobierno publicados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). En la Unión Europea se utilizan alrededor de 10 millones de animales anualmente. Los roedores y los conejos son los animales más utilizados. Los ratones representaron el 59% del total (Unión Europea, 2010).

Dentro de los modelos de experimentación sin duda, es el ratón, el más conocido y el más utilizado en la investigación biomédica. Son mamíferos de pequeño tamaño, tienen características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas similares al humano y comparten el 99% de sus genes. Poseen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios, lo que permite controlar las variables ambientales en los experimentos (Hernández, 2006).

El desarrollo de la ciencia de los animales de laboratorio ha permitido contar con líneas de roedores genéticamente definidas. Se cuenta con más de 9500 líneas que permiten hacer experimentos eliminando la variabilidad de origen genético como las líneas consanguíneas, transgénicas, Knock-out, Knock-in y modelos humanizados, entre otros. Recientemente el uso de la técnica CRISPR ha permitido generar modelos específicos para enfermedades raras (The Jackson Laboratory, 2018; Montoliu, 2019).



La gran oferta de modelos murinos resulta en un alto costo de mantenimiento. La exposición a mutaciones espontáneas, la contaminación genética, la infertilidad, el envejecimiento y en muchos casos las dificultades para reproducirlos, se traducen en grandes pérdidas económicas. La mayoría de las líneas mutantes tienen un uso limitado ya que se crean para investigaciones específicas. No obstante, es una práctica académica preservar estas líneas para uso científico y verificación de datos. Sin embargo resulta una decisión éticamente cuestionable mantener animales vivos, por el hecho de preservar los modelos (Glenister y Thornton, 2000; Landen 2005). Es una obligación moral de los investigadores maximizar el refinamiento y la reducción para cumplir con los principios de las 3R's (reducción, refinamiento y reemplazo) en el uso de animales (Russell y Burch, 1959).

Como una alternativa para satisfacer los requerimientos éticos y salvaguardar estos modelos biológicos, tan valiosos para la ciencia, se han desarrollado técnicas reproductivas que permiten la conservación de gametos. La criopreservación de gametos se ha convertido en la tecnología líder para la conservación a largo plazo de germoplasma (Knight y Abbott, 2002; Benavides y Guenet, 2004).

La criopreservación de espermatozoides, embriones, tejido ovárico y ovocitos son los mejores métodos para salvaguardar el genoma (Critser y Russell, 2000; Kashuba y col., 2008).

La criopreservación de los espermatozoides fue realizada por primera vez por Polge y col. en 1949, en ratón se logró por primera vez en la década de 1990 (Thornton y col., 1999; Glenister y Thornton, 2000; Sztein y col., 2000; Nakagata, 2002; Landel, 2005). No requiere la producción específica de ratones para este fin, ni equipo específico y costoso (a menos que se aplique el método de congelación lenta). Es un método rápido, bastante simple y con solo dos machos se pueden obtener 18 dosis de esperma, suficiente para preservar una línea de ratones (The Jackson Laboratory, 2018).

Si bien, se ha aplicado para muchas líneas mutantes, existen dificultades en la recuperación de descendientes modificados genéticamente por fertilización in vitro (FIV) con espermatozoides congelados de cepas de fondo genético común como: C57BL /6, BALB/c y 129 (Sztein y col., 2000; Nakagata, 2002; Landel, 2005). La FIV requiere previamente la superovulación de donadoras de oocitos y la sincronización de receptoras, lo que se traduce en mayor costo y experticia.

Técnicas avanzadas para la FIV, tales como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) o la incisión parcial en la zona pelúcida (ZIP) requieren equipos avanzados y mucho entrenamiento de laboratorio (Glenister y Thornton, 2000; Landel, 2005). Validar el stock de esperma congelado por estos métodos es complicado y costoso.

El primer método exitoso de criopreservación de embriones de ratón fue publicado por Whittingham y col. en 1972. Desde entonces, embriones de mamíferos congelados-descongelados han generado descendencia en muchas especies (Galli y Lazzari, 2008). Miles de líneas de ratones han sido conservadas en muchos centros y repositorios de ratones a gran escala, como European Mouse Mutant Archive (EMMA), Unidad de Genética de Mamíferos de MRC (Harwell, Reino Unido), The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EE. UU) y el Instituto Nacional de Salud (Bethesda, Maryland, EE. UU).

La principal ventaja de la criopreservación de embriones es que las células son diploides. Sin embargo, se necesita un gran número de animales, de 20 a 50 hembras donantes y de 5 a 10 machos reproductores. La obtención de la cantidad y calidad deseadas de los embriones a congelar puede llevar varias semanas a meses, dependiendo del genotipo en caso de cepas mutantes y del esquema de apareamiento (Rall y Fahy, 1985; Oktay y col., 2000; Mazzur y col., 2008). Esto determina que sea una técnica muy costosa, consume mucho tiempo y requiere mucho trabajo. Este método no es adecuado para la intervención en crisis o para rescatar a una "última línea" (Glenister y Thornton, 2000; Landel, 2005).

La criopreservación de ovocitos de mamíferos, en contraste, sigue siendo un desafío debido a que las estructuras celulares son particularmente sensibles a la temperatura y a los cambios. Para ovocitos de mamíferos, el método de vitrificación se ha utilizado en varias especies, incluidos ratones, conejos, vacas y humanos (Jimenez-Trigos y col., 2014; Choi y col., 2015; Ezoé y col., 2015; Shanshan y col., 2015). En comparación con los métodos tradicionales de criopreservación, la vitrificación es más efectiva, más fácil de realizar y requiere menos tiempo. Sin embargo, la vitrificación puede tener efectos adversos en los ovocitos como la confusión del huso, el endurecimiento de la zona pelúcida y la muerte, principalmente debido al uso de altas concentraciones de crioprotectores que tienen un efecto tóxico en las células. El tamaño relativamente grande de los ovocitos de mamíferos (~ 80  $\mu\text{m}$  para ovocitos de ratón) hace que el material genético dentro de las células sea más susceptible a los cambios de temperatura y a los reactivos (Martino y col., 1996; Stachecki y col., 1998; Kubota y col., 1998).

El interés sobre la técnica de trasplante de ovario (TOv) surge a partir del siglo XIX, pero no llega a completarse hasta el siglo XX. Recién en las últimas décadas ha resurgido su aplicación con el desarrollo de la criopreservación de tejido ovárico (Thornton y col., 1999; Glenister y Thornton, 2000; Landel, 2005; Mazur y col., 2008).

En medicina humana tiene amplia aplicación porque permite restaurar la fertilidad de mujeres jóvenes que sufren infertilidad y menopausia prematura debido a la pérdida iatrogénica de la función ovárica resultante de quimio y radioterapias. También posibilita la reproducción a edad avanzada en mujeres sanas (Patridgea y col., 2004; Li y col., 2015).

En el área de la medicina veterinaria representa una tecnología potencialmente útil para la conservación de recursos genéticos de animales salvajes, domésticos y experimentales por su sencillez y bajo costo (Migishima y col., 2003).

El tejido ovárico murino es altamente eficiente, ya que el ovario contiene numerosas células germinales femeninas. Se puede extraer fácilmente de las donantes preseleccionadas y la congelación requiere menos trabajo preparativo que la congelación embrionaria. Sólo se necesitan instalaciones básicas de laboratorio y unos cuantos animales para preservar una línea (Nakagata, 2002).

El TOv tiene entre otras ventajas que la edad de los animales es de menor importancia o irrelevante en comparación con el trasplante de embriones. Se puede restaurar la fertilidad mediante el TOv de reproductoras envejecidas así como también a partir de ovarios de ratón recién nacido y de ovarios recuperados de animales recientemente

mueritos (no más de 48 horas) y ser trasplantados restaurando la fertilidad (Sztein y col., 1998; Wang y col., 2008; Youm y col., 2014).

La técnica fue descrita por primera vez por Robertson en 1940. Desde 1945, la transferencia de ovarios frescos se ha utilizado en los Laboratorios Jackson para mantener cepas de ratones con problemas de reproducción. Esta técnica fue modificada y publicada por varios investigadores (Russell y Hurst, 1945; Stevens, 1957; Cunliffe-Beamer, 1983).

La congelación de tejido ovárico como complemento de la técnica de TOv se comenzó a investigar desde la década de 1950. En 1960 Parrot reportó la primera obtención de crías a partir del TOv congelado a  $-79^{\circ}\text{C}$  utilizando un método de congelación lenta con 15% de glicerol, cuya principal limitante fue la posibilidad de preservar el tejido a esa temperatura por no más de 44 días (Sztein y col., 1998).

Desde las primeras publicaciones sobre la criopreservación de ovario, muchas variaciones en la metodología han sido desarrolladas. Actualmente es posible congelar el ovario con la metodología apropiada de congelación- descongelación e implantación quirúrgica de los ovarios en receptoras y producir ovocitos viables para la fertilización de embriones. El método de congelación rápida por vitrificación en ratones, se aplica desde el año 2000 (Courbiere y col., 2006). Existen numerosos reportes de su utilidad en múltiples líneas de ratones (Chen y col., 2006; Hani y col., 2006; Hasegawa y col., 2006; Migishima y col., 2006; Bagis y col., 2008).

El desarrollo de la ingeniería genética ha permitido la generación de un creciente número de modelos animales genéticamente modificados (GM). Estos avances han determinado un aumento cuantitativo en el espacio de las instalaciones de animales de laboratorio y un riesgo creciente de perder los valiosos modelos que se van generando. Se requieren métodos económicos y efectivos, además de la congelación de embriones y esperma para preservar las líneas de ratón GM en expansión. La aplicación del TOv ha sido reportado en varias líneas pero en modelos GM existen pocos estudios. Las líneas transgénicas son particularmente más sensibles a las presiones de selección y divergencia genética, la implementación del procedimiento de criopreservación y TOv brinda la posibilidad de preservar por tiempo indefinido estos modelos.

En el bioterio del CUDIM se cría un modelo triple transgénico (3x Tg) para Enfermedad de Alzheimer. La puesta a punto del TOv y la vitrificación permitirían conservar y disponer de estos ratones según requerimientos, sin tener que asumir los costos y riesgos que conlleva el mantenimiento de un núcleo de fundación. Además permite aplicar los requisitos y objetivos de las 3R's en investigación animal (Russel y Burch, 1959).

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### El animal de laboratorio

Según la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, el término “animal de laboratorio” (también referido como animal) se define como cualquier animal vertebrado, (es decir animales tradicionales, de agricultura, silvestres y especies acuáticas) producidos para o utilizados en investigación científica, ensayos o enseñanza (National Research Council, 2017).

“El animal de laboratorio es un animal definido, con claros antecedentes genéticos y microbiológicos, con una comprobación sistemática de estos antecedentes, originado y mantenido en condiciones controladas según los requerimientos de la especie” (Nomura, 1987).

El uso responsable y racional de estos animales de experimentación, conlleva un conocimiento previo de sus características biológicas (anatómicas, fisiológicas y etológicas), y de mantenimiento (alojamiento, alimentación y manejo) apropiado que satisfagan todas sus necesidades, promuevan su salud y bienestar, para lograr el fin propuesto.

Por esta razón, se ha desarrollado a nivel mundial toda una estructura en torno a la ciencia de los animales de laboratorio, tanto a nivel gubernamental como privado.

A partir de 1940 se creó una especialidad dentro de la medicina veterinaria: “la ciencia de los animales de laboratorio”. Los expertos de OMS/FAO en una reunión realizada en 1972 fijaron el inicio de la estandarización de los biomodelos. En la actualidad esta ciencia ha alcanzado niveles elevados de perfeccionamiento y desarrollo en los campos relacionados con los aspectos arquitectónicos y funcionales de los bioterios, así como en la calidad y estandarización animal. Elementos que garantizan la validez, confianza, reproducibilidad y eficiencia de las pruebas y de la producción biológica (National Research Council, 2017).

Muchos países como Estados Unidos, Japón, Canadá y la Comunidad Económica Europea y cada vez más países de América cuentan con legislaciones que regulan el uso de los animales de laboratorio. Existen además normativas internacionales que son principios y recomendaciones contenidas en documentos de referencia como la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (National Research Council, 2017).

En Nuestro país se ha asumido un proceso de concientización, regulación y desarrollo para acercarse a los estándares establecidos en los países desarrollados (CNEA, 2014). En materia de legislación se cuenta con:

- Ordenanza sobre el uso de animales en experimentación, docencia e investigación Universitaria. Res N° 11 CDC del 21/12/1999.
- Tenencia responsable de animales. Ley N° 18.471 D: O: 21/04/2009-N° 27714.
- Utilización de animales en actividades de experimentación. Ley 18.611 del 21/10/2009.
- Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) y Comités de ética Institucionales. 28/03/2014 (Ley 18.611).

Los modelos animales son determinantes para conocer los mecanismos del organismo, la acción de los fármacos, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y el avance hacia los ensayos clínicos.

Un modelo animal es una imagen del hombre u otras especies, utilizado para investigar circunstancias fisiológicas o patológicas, que se crea y se utiliza en la investigación de las causas, naturaleza y tratamientos de los fenómenos funcionales y de las enfermedades humanas y animales (Zuñiga y Orellana, 2016).

Dentro de los modelos de experimentación sin duda, el ratón es el más conocido y utilizado en la mayor parte de las experiencias in vivo de biología y medicina, es en general el modelo elegido para conocer la reacción de un organismo mamífero frente a una agresión, una intoxicación o una infección experimental (parasitaria, bacteriana o vírica), reacciones o trastornos inmunológicos, oncología, teratología y embriología. Muchos investigadores consideran al ratón como un modelo animal casi perfecto porque además de su corto tiempo generacional, alta performance reproductiva y fácil mantenimiento, son los animales más sofisticados que pueden ser utilizados por los investigadores (Benavides y Guenet, 2004).

Cuando se completó el genoma humano a principios del siglo XXI, la siguiente especie de la cual se obtuvo todo el genoma fue el ratón, exactamente de la cepa consanguínea C57BL/6J. Cuando se compararon ambos genomas se descubrió que hay una homología de más del 99%. Todo ello ha hecho posible la creación de miles de estos modelos animales modificados genéticamente para estudiar diferentes enfermedades humanas y animales. En la actualidad se han desarrollado más de 9500 líneas y perfeccionado una gran variedad de modelos animales, a fin de cubrir las exigencias de los investigadores para llevar a cabo los experimentos cada vez más precisos. Existen más de 478 cepas consanguíneas de ratón y 234 de rata de laboratorio. Dentro de éstas, las hay de uso general o especial, como los modelos para enfermedades autoinmunes, endócrinas y tumorales. También se destacan los híbridos F1, cepas congénitas, coisogénicas, transgénicos, knock-out y Knock in (The Jackson Laboratory, 2003, 2018).

El rápido desarrollo de la ingeniería genética y de la tecnología de manipulación embrionaria durante la pasada década ha generado organismos genéticamente modificados (OGM). Los transgénicos son OGM a los que se les han añadido genes de otra especie. Los OGM a los que simplemente se les inhibe o potencia la expresión de uno de sus genes son OGM a secas (no transgénicos) (Gordon y Ruddle, 1981).

Desde que este tipo de tecnología ha sido accesible una gran cantidad de modelos animales se han producido para el estudio de enfermedades humanas y animales. Los ratones, son los animales más importantes en la investigación transgénica. La técnica de transgenización ha supuesto un enorme salto cualitativo en el avance de la genética de desarrollo permitiendo obtener modelos animales de enfermedades humanas como la rápida expansión de las colonias de ratones mutantes para la investigación biomédica.

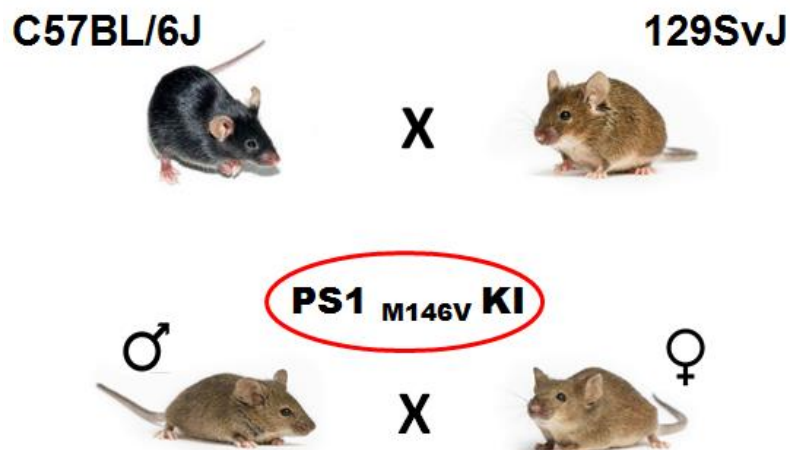
El Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM) está desarrollando una línea de investigación de la Enfermedad de Alzheimer (EA) para lo cual adquirió en el laboratorio Jackson de USA un modelo triple transgénico para EA: B6; 129-*Psen1<sup>tm1Mpm</sup>* Tg (APPSwe, tauP301L) 1Lfa/J (3xTg) desarrollado por el Dr. Frank LaFerla de la Universidad de California. Los ratones triples transgénicos son aquellos mutados para

APP/PS/tau. Este es el único modelo que recrea la patología completa de la EA (beta amiloide y taupatía) y permite estudiar todo el curso de la enfermedad en aproximadamente 12 a 15 meses (The Jackson Laboratory, 2003; Oddo y col, 2003).

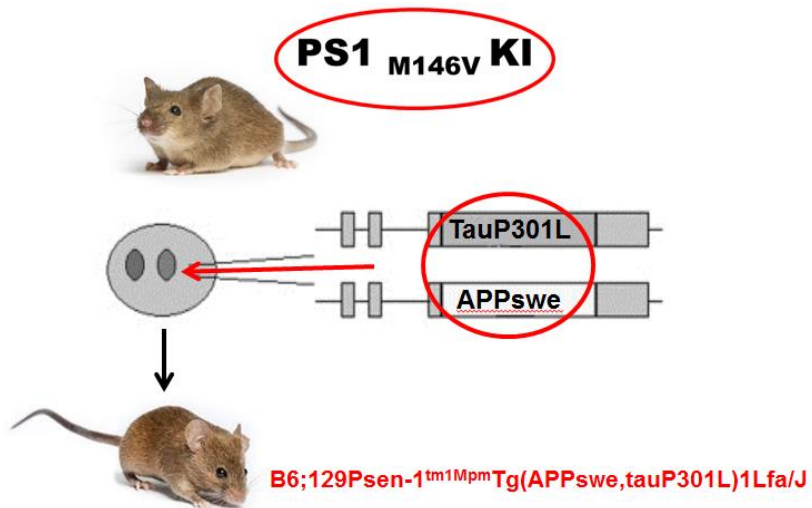
La EA es una enfermedad neurodegenerativa severa que se caracteriza por pérdida irreversible de la memoria y daño en las funciones cognitivas. Los signos patognomónicos de la EA son la formación de placas seniles en corteza cerebral e hipocampo, compuestas por agregados del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y la aparición de redes neurofibrilares causadas por la proteína tau hiperfosforilada, acompañados de degeneración neuronal, pérdida de sinapsis, daño vascular y gliosis reactiva, que se correlaciona con deterioro cognitivo y pérdida de la memoria, además de cambios celulares y moleculares asociados (Ball y col., 1985; Rogawski y Wenk, 2003; Selkoe, 2001). Existe una predisposición a desarrollar tempranamente esta enfermedad que está determinada por la presencia de alguno de estos 3 genes, que son: la proteína precursora de amiloide (APP); la presenilina 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2) y la apolipoproteína E (APOE) (Oddo y col, 2003; The Jackson Laboratory, 2003).

El modelo de ratón humanizado 3x Tg fue generado (fondo genético) en un ratón híbrido obtenido por el cruzamiento de dos cepas C57BL/6J y 129/SvJ; al que por ingeniería genética se le sustituyó una secuencia genética particular por la PSN1 mutada, obteniendo de esta manera un ratón Knock-in (Guo y col., 1999). Los embriones de estos ratones knock-in se co-inyectaron con dos transgenes humanos mutantes independientes: TAU y APP (The Jackson Laboratory, 2003; Billings y col., 2005).

El proceso de generación se puede observar en las Figuras 1 y 2.



**Figura 1.** Generación de ratón Knockin. Fuente Adaptada de Oddo y col, 2003.



**Figura 2.** Generación del ratón transgénico. Fuente: Adaptada de Oddo y col, 2003.

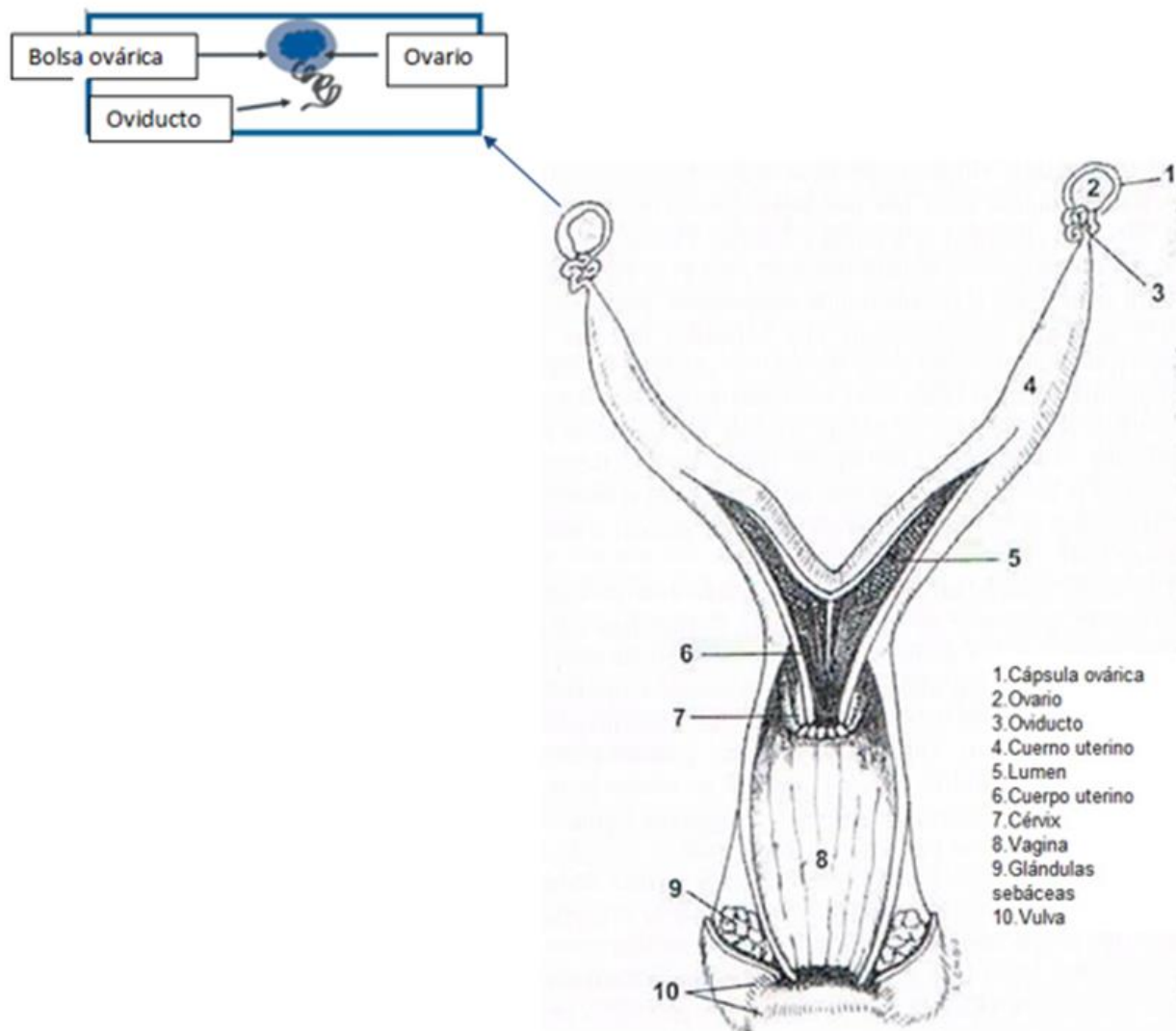
Este modelo es mantenido mediante cruzamientos endogámicos, debiéndose confirmar la presencia de la mutación mediante monitoreo genético. Si bien este modelo es apto para reproducción natural, la estabilidad de la mutación tiene un alto riesgo. Mantener a estos animales vivos genera el riesgo de perder el modelo por contaminación o deriva genética, alteraciones reproductivas, enfermedades y accidentes a gran escala, entre otras causas. Con el fin de facilitar su mantenimiento y preservación se están comenzando a desarrollar biotecnologías reproductivas para la creación de un banco genético (Nakagata, 2002; Benavides y Guenet, 2004; The Jackson Laboratory, 2007).

Un banco genético de animales se define como el almacenamiento a largo plazo de genomas de manera tal que permite obtener animales a partir de estos, siempre y cuando se requiera. Esta herramienta, sobre todo en ratones se ha vuelto habitual y de gran utilidad para la preservación de los diferentes modelos, y para no repetir la producción de los modelos ya existentes (reducción), la accesibilidad para los investigadores y una solución para la limitación de espacio físico en los bioterios (Nakagata, 2002).

## **Características reproductivas de la hembra de ratón de laboratorio**

### **Anatomía del aparato reproductor**

El aparato reproductor de la hembra está compuesto por 2 gónadas (ovarios) donde se producen los gametos y las hormonas sexuales y una estructura tubular (oviductos, útero, cérvix y vagina) necesaria para el transporte de los gametos (Figura 3).



**Figura 3.** Anatomía del aparato reproductor de la hembra de ratón. Fuente adaptado de Cook, 1965.

Los ovarios son 2 pequeños órganos ovaes de  $3\text{mm}^3$ , localizados cerca del riñón suspendidos desde la pared dorsal por los ligamentos mesováricos. Están contenidos en una bolsa o cápsula ovárica que los separa de la cavidad abdominal. Esta cápsula está rodeada por tejido adiposo que incluso puede ser de mayor extensión que el propio ovario. La estructura del ovario está conformada por médula y corteza. En la corteza se alojan los folículos en todos sus estadios de desarrollo, cuerpos lúteos y tejido intersticial. La médula está conformada por tejido conectivo, sangre y vasos sanguíneos. La superficie del ovario está constituida por una capa de células epiteliales. La función de los ovarios es producir gametos y hormonas esteroideas las cuales determinan los caracteres sexuales secundarios, el desarrollo del tracto reproductivo y folículos ováricos. En la vida intrauterina se desarrollan miles de folículos primordiales con los cuales nacerá la hembra que permanecerán en latencia hasta la pubertad, la cual se alcanza a las 4 a 5 semanas de vida aproximadamente (Fox y col., 2006).



Los ovarios se conectan con el útero a través del oviducto, dicha estructura mide unos 1,8 cm de largo. Está compuesta por mucosa ciliada rodeada de tejido muscular. El oviducto se divide en tres secciones: la ampolla, el istmo y una corta porción que se conecta directamente con el útero, el infundíbulo. La ampolla es la porción más proximal, se caracteriza por su elasticidad, puede extenderse varias veces su tamaño cerca de la ovulación, para alojar a los ovocitos. El infundíbulo está rodeado de células ciliadas que cumplen un rol fundamental en el transporte de los ovocitos a la ampolla donde se produce la fertilización. Las funciones del oviducto son estimuladas por hormonas esteroideas producidas por los ovarios las cuales afectan el desarrollo y transporte del embrión.

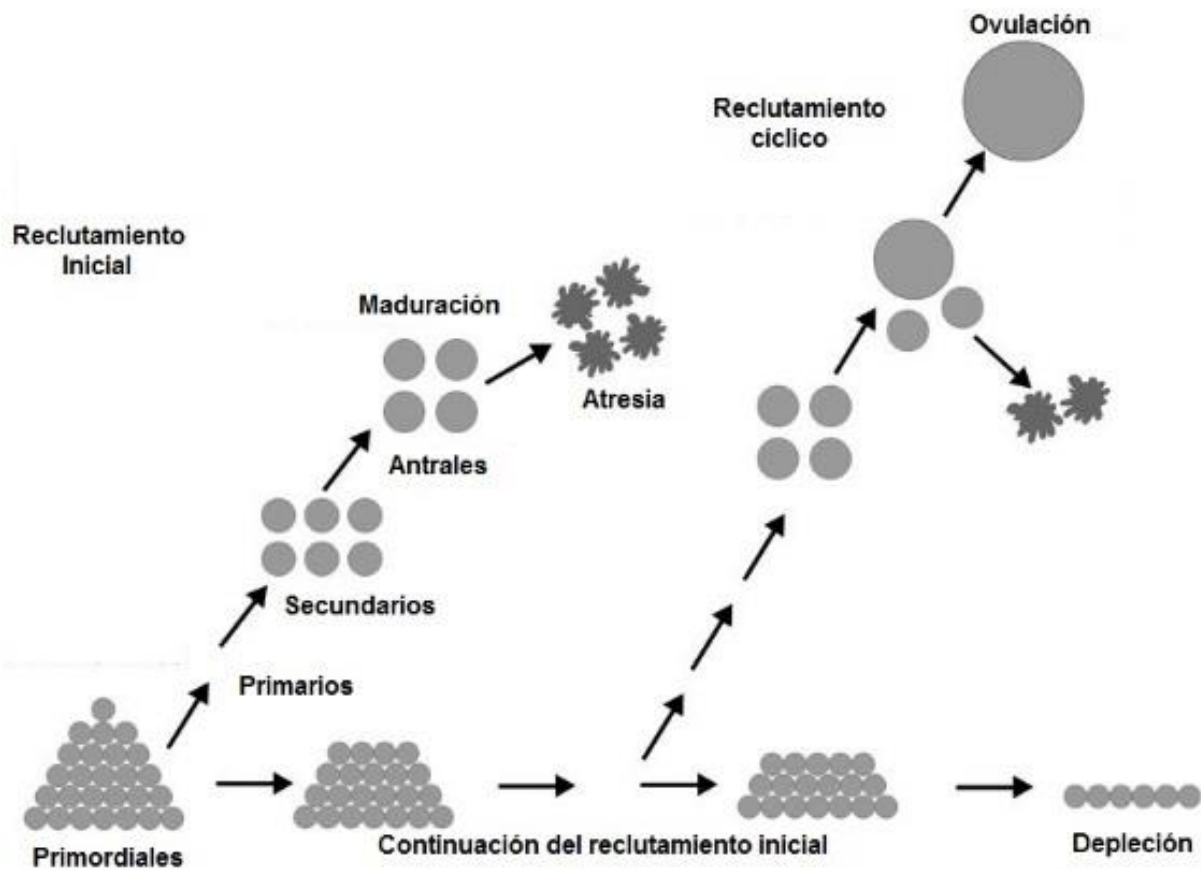
El útero en ratonas es bicorne con un cuerpo uterino corto dándole la apariencia de una "Y". El cuerpo está dividido por un septum que le impide la implantación. El cuerpo del útero está ubicado cerca de la vejiga suspendido desde la pared dorsal por los ligamentos del mesometrio. Al igual que el oviducto responde a las hormonas secretadas por el ovario, sufriendo cambios dramáticos durante el ciclo estral y la preñez. Si la hembra está preñada, el embrión en estado de blastocisto al 5to día se implanta en la pared del útero, donde continúa su desarrollo hasta el momento de la parición.

El cérvix ampliamente compuesto por tejido conectivo está separado en dos canales en la mayoría de su longitud y se proyecta hacia la vagina por su extremo distal. La vagina se extiende desde el cérvix al orificio vaginal, es corta y muscular. Las células epiteliales de la vagina sufren cambios durante el ciclo estral lo que se usa para determinar la etapa del ciclo. En la pared anterior de la vagina está el clítoris constituido por tejido eréctil y a su lado las glándulas sebáceas que son análogas a las glándulas prepucciales del macho (Cook, 1965; Fox y col., 2006).

### **Fisiología del aparato reproductor**

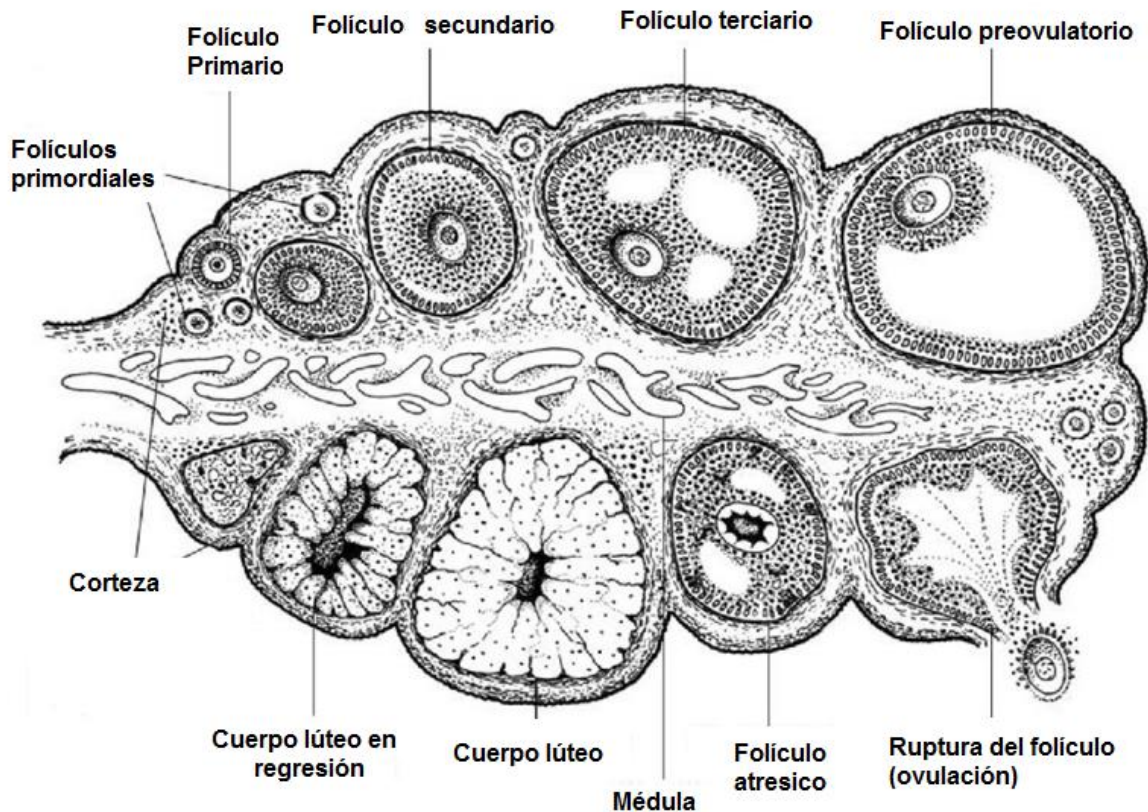
Las hembras al nacer portan en sus gónadas alrededor de 3000 folículos primordiales por ovario (Nakagata, 2002; Johnson y col., 2004; Myers y col., 2004), más de la mitad de estos folículos sufren un proceso de degeneración antes de las 3 a 5 semanas de edad (Faddy y col., 1983). Cuando las hembras alcanzan la pubertad cada ovario contiene aproximadamente  $10^4$  ovocitos en diferentes etapas de desarrollo (Silver, 1995; Faddy y col., 1992).

En el adulto los ovocitos se alojan dentro de folículos ováricos en distintos estadios de desarrollo los cuales maduran durante cada ciclo reproductivo, este proceso se conoce como foliculogénesis. Algunos folículos primordiales se desarrollan a primarios, secundarios, terciarios y pre ovulatorios (McGee y Hsueh, 2000). La evolución de los folículos se puede observar en la figura 4 a continuación.



**Figura 4.** Evolución de los folículos. Fuente Adaptado de McGee y Hsueh, 2000.

La variación de dichos estadios está determinada por el número de capas de células granulosas que rodean el ovocito y la formación de un antro folicular. Un folículo primario presenta una sola capa de células granulosas, mientras que un folículo secundario presenta al menos dos capas de células granulosas y además células tecales. Cuando se desarrolla el antro folicular el folículo se considera en estadio terciario. Durante todo este proceso el ovocito se desarrolla de manera tal que el folículo pre ovulatorio o de Graaf es un ovocito maduro rodeado por una zona pelúcida y células del cúmulus, varias capas de células granulosas y células tecales que se llegan a diferenciar por su ubicación en teca interna y externa (Eppig, 1977), (Figura 5).



**Figura 5.** *Diferentes etapas de la actividad ovárica. Fuente: Dyce y col., 2002.*

El lapso de foliculogénesis en ratones suele ser de alrededor de 20 días, cuya principal estimulación es dada por la hormona folículo estimulante (FSH), esta hormona incentiva la síntesis y secreción de estrógenos por parte de las células de la teca interna del folículo. Los estrógenos generan un feedback positivo sobre el hipotálamo de manera tal que estimulan la liberación de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y con ello una elevación de la hormona luteinizante (LH) hasta que desencadena la ovulación, produciendo una abertura que asegura el vaciado del contenido del folículo de Graaf. Los folículos restantes que estaban en desarrollo, pero no llegan a ovular se atresian, ya que solo ovula el 0,1% del total de folículos primordiales. El número de óvulos por ovulación es de 6 a 16, variable según la línea de ratón (Faddy y col., 1992; The Jackson Laboratory, 2007).

Justo antes de la liberación del ovocito se completa la primera división meiótica y se forma el primer cuerpo polar, inmediatamente después comienza la segunda división meiótica que se detiene en la metafase. Los óvulos permanecen viables por 10 a 15 horas post-ovulación. Si se produce la fertilización termina la segunda división meiótica, que genera un segundo cuerpo polar. Cabe destacar que las células germinales femeninas nunca son haploides ya que expulsan el segundo cuerpo polar en el momento en que reciben el grupo haploide de cromosomas proveniente del espermatozoide (Fox y col., 2006).

Una vez que se produce la ovulación las células del folículo ovárico se luteinizan transformando al folículo ovárico en cuerpo lúteo, dicha estructura sintetiza progesterona, hormona fundamental para la preñez. Si la fecundación no se produce el cuerpo lúteo será lisado por acción de la hormona prostaglandina F2alfa producida a nivel uterino. Esto produce descenso de los niveles de progesterona, requisito previo para que se produzca la próxima ovulación. El embrión genera proteínas que bloquean el mecanismo que genera la luteólisis (Fox y col., 2006).

Los estados reproductivos por los que puede pasar una hembra adulta son: ciclando, preñez, pseudopreñez, anestro y senescencia.

### **Ciclo estral**

El ciclo reproductivo de los ratones se conoce como ciclo estral. Es el período de tiempo desde la aparición del estro hasta el inicio del siguiente estro.

Las hembras de la especie *mus musculus* son poliéstricas continuas. Los ciclos se inician cuando alcanzan la pubertad a las 5 a 8 semanas de edad. El ciclo estral está compuesto por una serie de cambios fisiológicos, endócrinos y comportamentales que ocurren en forma espontánea, aproximadamente cada 4 días a lo largo de su vida reproductiva, salvo que sean interrumpidos por preñez, pseudopreñez o anestro (Silver, 1995; Fox y col., 2006).

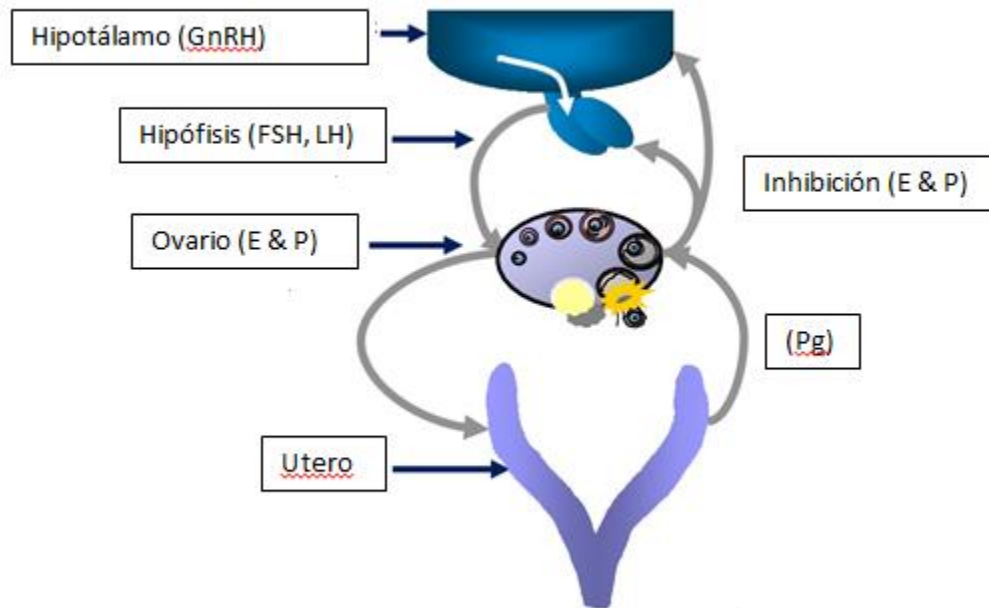
La madurez sexual en las hembras ocurre antes que en los machos. Mientras que las hembras normalmente se utilizan para la reproducción a los 45 a 50 días de edad, los machos no están listos hasta los 60 días de edad. La madurez sexual puede demorarse aproximadamente una semana en ambos sexos y depende también de las líneas de ratones y de las condiciones ambientales. El modelo 3x Tg alcanza la madurez reproductiva a los  $43 \pm 2$  días.

La vida reproductiva de las hembras es de 7 a 8 meses pero generalmente son mantenidas como reproductoras hasta los 6 meses, debido a que a partir de la tercera generación el número de crías por camada disminuye. Los machos pueden reproducirse exitosamente por más tiempo que las hembras porque la espermatogénesis continúa durante toda la vida. Muchos machos tienden a tener sobrepeso con la edad, lo que puede afectar negativamente a su capacidad reproductiva. A menudo se recomienda retirar los machos viejos (9 a 10 meses de edad) y armar parejas con machos jóvenes (Silver, 1995).

### **Control neuroendócrino del ciclo estral**

La fisiología reproductiva en la hembra se regula por acción del sistema nervioso en conjunto con el sistema endócrino, conformando el eje hipotálamo hipofisario gonadal (Figura 6). La madurez sexual coincide con la liberación pulsátil de la GnRH, que cumple un rol fundamental en la regulación del ciclo estral. Esta hormona se sintetiza y se acumula como neuro hormona en células del hipotálamo, al liberarse actúa sobre la hipófisis, donde estimula la síntesis de las hormonas: FSH y LH. Los niveles crecientes de FSH desencadenan el crecimiento y la maduración folicular y la LH es la responsable

de la ovulación. Estos cambios se reflejan en la producción de esteroides ováricos, durante cada ciclo estral (Cook, 1965; Fox y col, 2006).



**Figura 6.** Control neuroendócrino del ciclo estral. Fuente: Cook, 1965.

### Factores que afectan el ciclo estral

La duración del ciclo puede variar en las diferentes líneas de ratón y está fuertemente influenciado por una serie de factores: genéticos, efectos ambientales, de manejo de los animales, estrés, feromonas y hormonas exógenas que modifican su duración e incluso pueden producir su interrupción (Silver, 1995).

Entre los efectos ambientales que pueden provocar cambios reproductivos se encuentran las deficiencias nutricionales, el estrés producido por el ruido, vibraciones, olores y cambios en el manejo de los animales y sistemas de apareamiento, el estado sanitario, los cambios estacionales (ritmos circadianos) y los ciclos de luz e intensidad dentro del bioterio.

Los ratones son animales de actividad esencialmente nocturna. El ciclo de luz controla el rendimiento reproductivo de hembras y machos. El ciclo de luz-oscuridad artificial de una instalación animal es crítico para el desarrollo sincronizado de los óvulos. La liberación de la hormona LH que induce la ovulación, está regulada por este ciclo. Las habitaciones de los animales se mantienen en ciclos programados de luz/oscuridad de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad o 14 horas de luz: 10 horas de oscuridad. Los eventos más importantes de la vida sexual del ratón ocurren durante la noche, o el correspondiente período de oscuridad dentro de los ciclos de luz programados en el bioterio (Fox y col., 2006).

En esta especie, como en otras, se han descrito “Efectos” producidos por las feromonas que producen la interrupción del ciclo estral (Zúñiga y Orellana, 2016; The Jackson Laboratory, 2018).

*Efecto Lee-Boot, 1955:* Cuando se agrupan hembras sin la presencia de machos pueden presentar supresión del celo por pseudopreñez o anestro. Si se agrupan en grupos pequeños es más probable que se produzca pseudopreñez y en grupos más grandes anestro. Según Whitten en estos casos se inhibe la liberación de FSH y aumenta la LH, situación que lleva a la aparición de pseudopreñez. Este bloqueo del ciclo regular se explicaría por la presencia de feromonas estrógeno-dependientes que actúan sobre los receptores ubicados en el órgano vomeronasal, ya que las hembras ovariectomizadas no son capaces de inhibir el estro en hembras normales.

*El Efecto Whitten, 1956:* afirma que las hembras que han permanecido aisladas y posteriormente son llevadas a la presencia de machos o expuestas a su olor, comienzan a presentar ciclos con regularidad, porque las feromonas de la orina de los machos inducen el estro en las hembras. Este efecto puede utilizarse para sincronizar el celo. Al 3er día la mayoría de las hembras serán receptivas a los machos.

*El efecto Bruce, 1959:* es la tendencia de las hembras a interrumpir la preñez luego de exponerse a un macho extraño o sus feromonas. En ratones, la preñez solo se puede interrumpir antes de la implantación del embrión. Si la hembra es separada del macho con el que se apareó inmediatamente después de la cópula y luego de aproximadamente 6 horas retorna con el mismo macho, el bloqueo se produce como si se tratara de un macho extraño. Esto implica que es necesario que el macho y la hembra permanezcan juntos por lo menos 4 a 6 horas, de esta manera la hembra reconoce como familiares a las feromonas masculinas. La memoria olfativa perdura 30 a 50 días. Pasado ese tiempo el macho original no es reconocido.

*El efecto Vandenberg, 1969:* Se refiere a la aceleración de la pubertad por la presencia de machos adultos en hembras prepúberes.

De manera artificial se puede interferir en algunas de las fases naturales del ciclo estral, para conseguir una mayor producción, adelantar el momento de la concepción o manipular los óvulos o embriones. Esto se puede lograr por la administración de hormonas exógenas. Las alteraciones más habituales suelen ser:

*Anovulación:* los anovulatorios (progesterona y derivados) impiden la maduración de los folículos e inhiben la ovulación. Se utilizan para sincronizar el celo de las hembras.

*Superovulación:* Es una práctica frecuente en ratones, mediante la inoculación de gonadotropinas se provoca la maduración y la expulsión de un elevado número de óvulos en un momento determinado. La eficacia del método depende de la edad, peso y línea, así como de la dosis de gonadotropinas y el momento de su administración (Nakagata, 2002; The Jackson Laboratory, 2007).

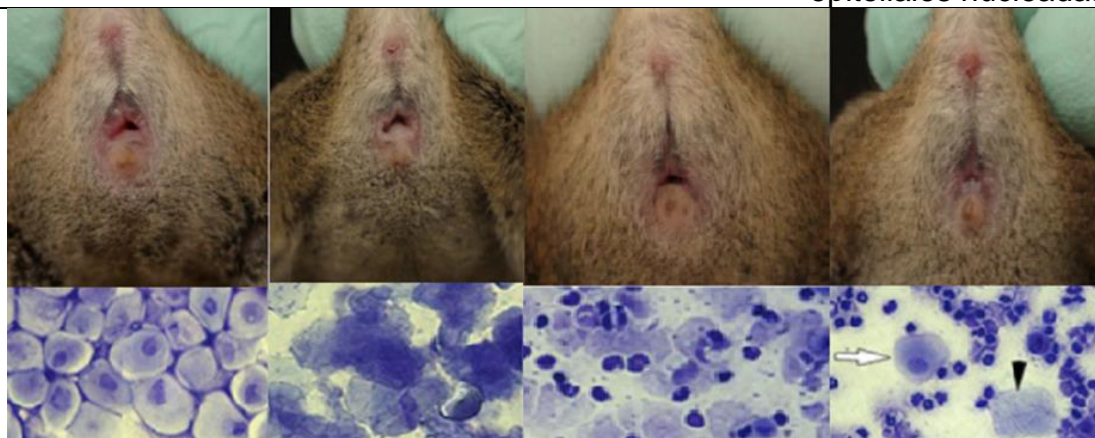
## **Etapas del ciclo estral**

Conceptualmente el ciclo estral está compuesto por 4 etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. Estas etapas ocurren en cada ciclo y de manera secuencial. El día del estro generalmente se designa como el día 1 del ciclo. El ciclo estral se acompaña de típicos

que pueden diferenciarse a través de colpocitología vaginal y/o en forma alternativa por la observación de la mucosa vulvar (Byers y col., 2012; McLean y col., 2012), (Tabla 1 y Figura 7).

**Tabla 1.** Características del orificio vaginal y frotis vaginal según etapa del ciclo estral.

| Etapa            | Orificio vaginal  | Frotis vaginal   |
|------------------|---|--|
| <b>Proestro</b>  | Color rojo- rosáceo, orificio dilatado, hendidura longitudinal desarrollada.                    | Células epiteliales nucleadas, ocasionales leucocitos y células epiteliales cornificadas.                    |
| <b>Estro</b>     | Edema y hendidura longitudinal prominente, orificio dilatado, mayor coloración que en proestro. | Abundantes células cornificadas, escasas células epiteliales nucleadas.                                      |
| <b>Metaestro</b> | Levemente edematizado, seco, pálido, pueden observarse restos de células blancas.               | Células cornificadas y numerosos leucocitos. Escasas células epiteliales nucleadas.                          |
| <b>Diestro</b>   | Orificio contraído, color pálido y húmedo.  | Moco, menos células que en otros estadios, predominan leucocitos y ocasionales células epiteliales nucleadas |



PROESTRO

ESTRO

METAESTRO

DIESTRO

**Figura 7.** Características del orificio vaginal y frotis vaginal según etapa del ciclo estral.

El proestro presenta una duración aproximada de 13 horas. Es donde acontece el desarrollo de folículos antrales y la elevación de la concentración de estrógenos y FSH. La hembra presenta la mucosa vulvar edematizada e hiperémica por la acción de los estrógenos. En la citología vaginal se observa predominancia de células epiteliales globosas nucleadas.

El estro es la etapa en la que se produce la ovulación aproximadamente a las 15 horas después del pico de LH, frecuentemente en horas de la noche. Por la acción de los estrógenos, la hembra se torna receptiva frente al macho por 10 horas aproximadamente. La mucosa vulvar continúa hiperémica y edematizada, siendo una característica del estro la apertura y enrojecimiento de la vulva. La citología vaginal muestra células epiteliales escamosas en empalizada y anucleadas.

El proestro y estro culminan en la ovulación, constituyen la fase estrogénica o de liberación de estrógenos. La vagina y los órganos genitales externos son receptivos a los estrógenos por lo tanto sus cambios son indicadores de concentraciones estrogénicas.

Durante el metaestro se produce la declinación de la concentración estrogénica y aumenta la progesterona o fase progesterónica. Su duración es de 13 horas. La vagina se observa pálida y seca, disminuye la abertura vaginal y el edema. Las células vaginales predominantes son los neutrófilos.

El diestro es la fase más extensa, se extiende por hasta 56 horas. Se observa gran cantidad de leucocitos junto con células nucleadas. La vulva se encuentra cerrada, sin secreción y pálida. Hacia el fin del diestro comienza un rápido crecimiento folicular, cambios en el útero y vagina hacia el comienzo del proestro.

El metaestro y diestro (o pseudopreñez o preñez) conforman la fase progestacional o luteal (Allen, 1922; Byers y col., 2012; McLean y col., 2012).

## **Cópula y Fertilización**

Normalmente el apareamiento se produce en el estro durante el período de oscuridad cercano a la ovulación, aunque es posible que la receptividad se extienda abarcando parte del proestro y metaestro.

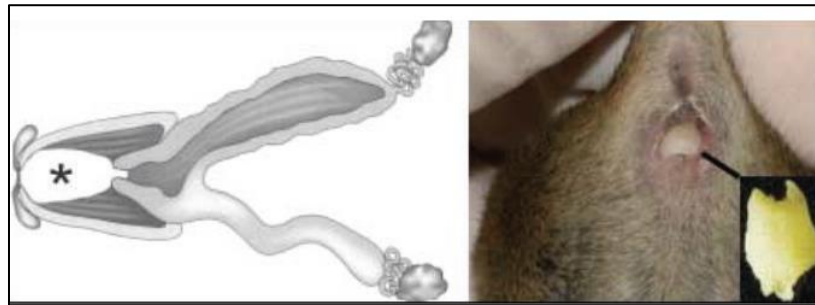
Después de la ovulación, los óvulos liberados por los ovarios ingresan al oviducto. Las hembras normalmente ovulan entre 6 y 16 óvulos en cada ciclo. Los óvulos recién ovulados están rodeados por una masa de células cúmulos (Fox y col., 2006; The Jackson Laboratory, 2018).

La monta puede variar en duración de 10 minutos hasta casi una hora, siendo un rasgo específico de cada línea. La concentración espermática se recupera recién a los dos días, aunque algunos machos de líneas no consanguíneas pueden copular (y preñar) hasta tres hembras en una sola noche (Fox y col., 2006).

En muchos casos, machos muy dominantes pueden obligar a las hembras a copular aún fuera del período fisiológico de receptividad sexual. Una gran proporción de estos apareamientos son estériles por la falta de sincronización con la ovulación espontánea.



La cópula se puede demostrar por la presencia en la vagina del llamado «tapón vaginal». El espermatozoide del macho coagula dentro de la vagina formando un tapón de aspecto blanquecino o de color crema. Este tapón está formado por una mezcla de secreciones de las glándulas sexuales accesorias del macho y secreciones vaginales. Persiste de 6 a 12 horas por lo que hay que revisar a las hembras que se ponen a aparear lo más temprano posible en el ciclo de luz, de lo contrario, el tapón puede desprenderse o disolverse. La naturaleza y la ubicación del tapón vaginal pueden ser una característica de la cepa. Puede ser superficial, lo que permite que se visualice fácilmente o profundo. Si es profundo, generalmente se puede ver abriendo la vagina suavemente. Debido a este tapón vaginal, a diferencia de otros mamíferos, la hembra del ratón puede ser fecundada sólo por un macho. La presencia de un tapón vaginal en la mañana siguiente a la copulación es indicador de apareamiento exitoso, pero no es indicador de preñez (Fox y col., 2006; The Jackson Laboratory, 2007; Perret, 2015) (Figura 8).



**Figura 8.** Tapón vaginal. Fuente: Perret, 2015.

El macho eyacula en el útero, el espermatozoide viaja a través de ambos cuernos uterinos para alcanzar el sitio de fertilización en la parte superior del oviducto (ámpula). Por lo general, más de un espermatozoide entra en el espacio perivitelino, sin embargo, sólo un espermatozoide penetra y fertiliza el óvulo. Los espermatozoides tienen capacidad fecundante aproximadamente por 6 horas, aunque mantienen una motilidad remanente durante más de 14 horas. Son eliminados por fagocitosis leucocitaria 24 horas después de la cópula. Los óvulos mantienen su fertilidad hasta por 10 a 15 horas (Benavides y Guenet 2004; The Jackson Laboratory, 2018).

Después de la fertilización, el cigoto se divide mitóticamente para eventualmente alcanzar la etapa de blastocisto, al 5to. día se implanta en el útero. Después de aparearse, el estímulo de acoplamiento desencadena la liberación de prolactina de la hipófisis, lo que conduce a la formación de un cuerpo lúteo funcional en el ovario, bloqueando la ovulación y ciclicidad para continuar con la gestación (Fox y col., 2006).

### **Pseudopreñez**

Es un estado que resulta de cópulas estériles, o que aparece en hembras aisladas o agrupadas entre sí. En los primeros momentos no es distinguible de la preñez, ya que la progesterona es segregada del mismo modo. Entre los días 7 y 8 se produce la regresión de los cuerpos lúteos y la caída de los niveles de progesterona. Si bien la duración de la

pseudopreñez oscila, por término medio entre 10 y 13 días, ésta puede también durar como una preñez normal; ello dependerá de factores tales como la edad de la hembra, más que de características genéticas (The Jackson Laboratory, 2007).

## **Gestación**

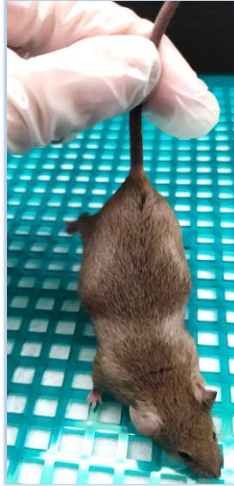
El ratón es una especie politoca y por lo tanto porta varios fetos en la misma gestación. El período de gestación para los ratones de laboratorio es generalmente consistente dentro de una cepa, pero varía entre las cepas. Oscila entre 18,5 y 19,5 días en las hembras primíparas y entre 19 y 21 días en las múltiparas, dependiendo del estado fisiológico, la constitución genética de la hembra y del número de crías que está gestando. La gestación es más corta cuando se trata de camadas híbridas que cuando son cepas puras, lo que probablemente está en relación con las diferencias antigénicas entre la madre y los fetos. El periodo de gestación en el modelo 3x Tg es de 19 a 20 días en primíparas y múltiparas respectivamente.

Los embriones se implantan y desarrollan en los cuernos uterinos. La placenta es discoidal, circunscrita y se delimita a una zona determinada de la vesícula embrionaria. Esta placenta sustituye al cuerpo lúteo, provocando su involución por la secreción de progesterona e inhibidores estrogénicos que impiden el desarrollo folicular y la ovulación. A través de la placenta se produce el pasaje de anticuerpos maternos al feto durante su desarrollo y se completan con los que recibirá por el calostro durante la lactancia.

El eventual aborto de uno de los fetos, no impide la llegada a término de los otros, lo que constituye una ventaja evolutiva. En el sistema de apareamiento permanente, en el que el macho y la hembra permanecen continuamente juntos, es habitual que se aproveche el celo posparto que aparece aproximadamente entre 16 y 24 horas después del mismo. En este caso, la implantación de los blastocistos en el útero sufre un retardo, alargando la gestación hasta una semana. La cornificación de la vagina es incompleta en este celo y la fertilidad es menor que la que se obtiene por el apareamiento en un ciclo normal. Si es fecundada, la hembra en lactación comienza a gestar a pocos días después del parto. En esas condiciones, cuando son más de 3 las crías en lactación, durante por lo menos 3 días se produce un retardo en la implantación porque la lactancia inhibe la secreción de las gonadotropinas hipofisarias. Esto conduce a que se prolongue la duración del período de gestación (Fox y col., 2006; The Jackson Laboratory, 2007).

## **Detección de la preñez**

Con frecuencia, se necesita saber exactamente cuándo un ratón concibió. Aunque no hay pruebas de preñez tempranas para ratones, se puede decir que una hembra se ha apareado en las últimas 8 a 30 horas si su vagina contiene un tapón vaginal. La preñez se puede observar entre los 10 y 12 días de gestación (Figura 9) y se puede palpar como una cadena de perlas a los 14 días. El día 1 de gestación es el día siguiente a la observación del tapón vaginal (Perret, 2015).



**Figura 9.** *Hembra a los 10 días de gestación.*

### **Parto y Lactación**

Si bien algunos autores no han encontrado una relación entre el inicio del parto y el ciclo luz/oscuridad, otros señalan que la mayoría de los nacimientos se producen en las horas de oscuridad. Se sabe que tanto la relaxina como la oxitocina intervienen en el parto del ratón (Fox y col., 2006).

La relaxina comienza a producirse hacia el día 13 de gestación, favoreciendo la movilidad y separación de la sínfisis pubiana. En cuanto a la oxitocina, hay discrepancias entorno a su papel como determinante de la expulsión de los fetos, ya que no ha sido detectada en sangre en ese momento. Se piensa que la prostaglandina podría ser la responsable de la motilidad uterina ya que los niveles sanguíneos se hallan incrementados (Fox y col., 2006; The Jackson Laboratory, 2007).

Excepto el primer feto, que por lo general sale del cuerno derecho, los otros son expulsados al azar. Las ratonas suelen ser madres excepcionales y se ocupan de forma meticulosa de las crías, desde el parto hasta el destete. Según van naciendo las crías, la madre devora la placenta y el cordón umbilical, lame a los pequeños hasta que comienzan a respirar y los coloca en el nido; luego expulsa la siguiente cría, ocupándose de ella de la misma forma. Sin embargo, es posible que la madre abandone las crías por falta del estímulo de la lactación o que incluso las devore. Todo el proceso del parto puede durar unas 2 horas. En general, paren entre 4 a 8 crías aunque debemos recordar que el promedio de crías por camada es un rasgo que depende fundamentalmente de la constitución genética de la madre. El modelo 3x Tg tienen en promedio 7 crías por camada.

Tras el parto, la producción y secreción de leche aumenta rápidamente, aunque después se inhibe, siendo necesaria la succión de las crías para mantener una producción constante durante toda la lactancia. La lactancia dura entre 19 y 21 días y las crías comparten las mamas (5 pares: 3 torácicas y 2 abdominales). No es raro observar que 2 madres alternen sus servicios y cuidados en un nido (The Jackson Laboratory, 2007).

El reflejo de expulsión de la leche es necesario no sólo para la liberación de oxitocina por la neurohipófisis, sino también para la secreción de hormonas de la hipófisis anterior, responsables del mantenimiento de la secreción láctea. La proliferación y el crecimiento de los conductos mamarios requieren de la acción de los estrógenos, somatotropina (STH) y adrenocorticotropina (ACTH), mientras que el crecimiento lóbulo-alveolar que acompaña las últimas etapas de la preñez es estimulado por los estrógenos, STH, ACTH, prolactina y progesterona. El complejo lactogénico está constituido principalmente por la prolactina y ACTH. La STH tiene importancia lactogénica en algunas cepas de ratón común.

En particular, la leche de estos roedores es muy rica en grasa y con más bajos porcentajes de agua. Los recién nacidos empiezan a mamar inmediatamente después del parto, pudiéndose observar fácilmente tras cada comida la leche en su estómago a través de su piel. Los máximos niveles de secreción láctea se alcanzan entre los 12 a 13 días posparto.

La edad óptima para el destete oscila entre los 19 y 21 días, aunque suele recomendarse 25 días en animales GM o inmunodeprimidos (Perret, 2015; The Jackson Laboratory, 2007). El Destete de los 3 x Tg se realiza a los 19 días.

El tiempo generacional en ratones de laboratorio es de aproximadamente 12 semanas: aproximadamente 3 semanas de gestación, 3 a 4 semanas de lactancia y 5 a 6 semanas para alcanzar la madurez sexual.

## **Senescencia**

A medida que las hembras van envejeciendo se hace insuficiente la cantidad de folículos en desarrollo para inducir el soporte hormonal necesario para una adecuada liberación de hormona GnRH, así como el posterior aumento de LH preovulatorio (Wu y col., 2005). La disminución de la función ovárica conduce a una falla reproductiva gradual que se caracteriza por una disminución progresiva de la fertilidad atribuida a la pérdida de folículos del ovario, disminución de la calidad de los ovocitos, defectos del útero relacionados con la edad y cambios en el eje neuroendocrino (Faddy y col., 1983; Wise y col., 1999).

Los cambios neuroendocrinos comunes en roedores hembras de mediana edad incluyen elevación de la hormona FSH, liberación alterada de LH (generalmente mayor duración y disminución de la frecuencia de pulsos) y una mayor variabilidad en la duración del ciclo estral (Wise y col., 2002).

Se cree que la disminución de la función ovárica está influenciada por deterioro progresivo en la función del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y es acompañado por una aceleración del agotamiento del folículo (Wu y col., 2005; Danilovich y Ram Sairam, 2006). La disminución de la función ovárica y de la calidad de los ovocitos hace que la reproducción eficiente de las hembras de laboratorio se limite a los 6 meses. Por lo tanto, la senescencia reproductiva se debe en parte al agotamiento de los folículos en las hembras de edad avanzada, lo que significa que los ovarios de hembras jóvenes tendrán un mejor rendimiento reproductivo si se utilizan como donantes para TOv. Es así que la

edad del donante de ovario también puede ejercer un efecto significativo en el resultado del proceso de criopreservación de tejido ovárico (Nakagata, 2002).

## **Criopreservación**

La criopreservación es una herramienta muy útil para la conservación de gametos, células, tejidos y embriones. Mediante este proceso las células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  para disminuir las funciones vitales y poder mantenerse en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo, manteniendo la integridad estructural a lo largo de todo el procedimiento. El frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones, quedando detenida cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte celular (Whittingham y col., 1972; Critser and Russell 2000).

Este procedimiento abarca varias etapas que implica una exposición inicial de células y tejidos a agentes crioprotectores (CP), enfriamiento a temperaturas bajo cero, almacenamiento, descongelación y finalmente, dilución y eliminación del CP con retorno al entorno fisiológico que permite el desarrollo (Whittingham y col., 1972).

El efecto físico de la baja temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$  o menos, hace que una solución cambie de estado líquido a sólido. El agua que contiene la solución, está combinada con sales. La presencia de sales hace que el punto de congelación disminuya a medida que aumenta la concentración (Mazur y col., 1972; Mazur, 1984).

El punto eutéctico de una solución es el punto térmico en el cual la solución a consecuencia de la congelación misma ya no tiene más agua libre, ya que toda se ha congelado, logrando la máxima concentración de las sales que estaban en la solución. Durante el proceso de congelación las células pueden sufrir daño: 1) formación de hielo intracelular, que ocurre cuando la muestra se enfría “demasiado rápido”, lo que hace que el agua quede “atrapada” dentro de las células; y 2) precipitación del agua como hielo debido a las altas concentraciones de soluto, que se generan cuando las células se enfrían “muy lentamente” (Mazur y col., 1972, Mazur y col., 1977, Mazur y col., 1984; Karlsson y Toner, 1996).

Los principales factores que intervienen en el proceso de enfriamiento lento son la velocidad de paso del agua y el CP a través de la membrana celular. La velocidad de enfriamiento depende de la composición, características y permeabilidad de la membrana, de la temperatura y de la relación superficie-volumen (Leibo, 1980; Mazur y Schneider, 1986). Estos parámetros permiten el cálculo de métodos óptimos para la adición y eliminación del CP, y las velocidades de enfriamiento y calentamiento necesarias para evitar la formación de hielo intracelular y los llamados “efectos de solución” (Mazur, 1990; Karlsson y Toner, 1996).

Los CPs son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución. Se incorporan al medio de congelación para proteger del frío y actuar sinérgicamente en la deshidratación de la célula. Tienen como función desplazar

o extraer el agua del citoplasma y así evitar que durante la congelación se formen cristales de hielo en el interior de la célula. Estos compuestos son de variadas estructuras químicas y diverso peso molecular. De acuerdo a la permeabilidad celular se pueden clasificar en permeables y no permeables. Dentro del grupo de CPs permeables se encuentran los polialcoholes o glicoles, como el metanol, glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO), etilenglicol (EG) y propilenglicol. Los no permeables son los azúcares, sean monosacáridos, disacáridos o trisacáridos. Dentro de este grupo también están otras moléculas de gran tamaño como la albúmina bovina y distintos polímeros sintéticos como la polivinilpirrolidona (PVP) o polivinilalcohol (PVA) (Woods y col., 2004).

Idealmente un CP debe ser de bajo peso molecular, debe pasar a través de la membrana celular por difusión, no ser tóxico y de alta solubilidad. Obviamente no todos los compuestos penetran la célula con la misma velocidad; por ejemplo el glicerol es más lento que el DMSO y este a su vez más lento que el EG, de manera que también el volumen final de la célula se ve afectado en función del CP. En otras palabras, la difusión del EG es rápida, la variación en el volumen de la célula pasa desapercibida, sin embargo con el glicerol, que difunde lentamente, se puede apreciar bajo la lupa como la célula se contrae y expande. Los CPs permeables presentan toxicidad variable en concentraciones de 1M o más.

La evidencia muestra que el DMSO, las soluciones a base de propanodiol y EG son igualmente efectivas para congelación de tejido ovárico de ratón pero la evidencia actual indica que es menos adecuado que los otros tres crioprotectores (Candy y col., 1997; Nakagata, 2002).

La solubilidad y viscosidad de los azúcares dependen de su estructura química. La rafinosa (trisacárido) es menos soluble que la sucrosa (disacárido) y esta menos que la glucosa (monosacárido). Los azúcares son denominados buffer o tampones osmóticos, no son permeables a la membrana celular pero crean una gran presión osmótica en el medio, ante la cual la célula responde eliminando el agua para equilibrar las presiones, por lo tanto, se deshidrata. Los azúcares y componentes con alto peso molecular son agregados frecuentemente para prevenir la excesiva hinchazón osmótica durante la salida del CP de la célula, contribuyendo a la estabilidad de membrana y previniendo la formación de cristales de hielo (Fahy, 1986).

### **Tipos de congelación**

Si exponemos una célula a las bajas temperaturas de congelación, el medio que rodea a la célula se enfriará más rápido que el interior de la misma, por lo tanto el medio externo, al congelarse, se volverá osmóticamente más concentrado que el interior de la célula. Debido a esto, la célula reacciona eliminando el exceso de agua (contracción), logrando que la presión producida por la concentración del medio interno se equilibre con la del medio externo. Este fenómeno de reacción de la célula por equiparar la presión osmótica, sea esta hipertónica o hipotónica, puede resultar peligrosa si no es controlada. Si la deshidratación es muy rápida o extrema, el daño producido será irreversible, por lo que se hace necesario determinar el tiempo de exposición (Portillo y col., 2006).

La evolución de la temperatura con el tiempo durante el proceso de congelación se denominada curva de congelación. La curva de congelación depende del tipo, origen, tamaño y estadio de la célula. El tipo de congelación se determina conforme a la temperatura en función del tiempo, dando como resultado tres tipos de congelación: 1) lenta, 2) rápida y, 3) ultra rápida (Mazur, 1990).

En el sistema de congelación lenta, por lo general la temperatura desciende aproximadamente 0,5°C por minuto hasta llegar a -80°C, de esta manera las células tienen tiempo suficiente para eliminar el agua y equilibrarse con el medio, por lo cual se llama también método de congelación equilibrado. Este procedimiento requiere equipo especializado de congelación para controlar la tasa de enfriamiento a temperaturas bajas. En el procedimiento de enfriamiento lento hay que equilibrar las células en concentraciones de CPs relativamente bajas (~1,5M) y la deshidratación durante el enfriamiento (0,3–2° C/min) (Elliot y Whelan, 1977; Mazur, 1990).

Estos métodos fueron los primeros que se aplicaron para criopreservar embriones y ovocitos de ratón. El enfriamiento lento está bien caracterizado y no se ha asociado con alteraciones genéticas graves pero pueden alterar los embriones en la fase S de duplicación del ADN y al inicio de la mitosis (Whittingham y col., 1972; Mazur, 1990; Pomeroy, 1991; Dulioust y col., 1995, Nakagata, 2002).

Las desventajas de este método es el tiempo que consume y por lo general requiere equipo específico. En el caso de los espermatozoides la velocidad de enfriamiento es relativamente rápida y simple de lograr con equipos improvisados (Balakier y col., 1991).

Con métodos de congelación rápidos o no equilibrados, la congelación ocurre más rápido que el tiempo que necesitan las células para deshidratarse y lograr equiparar la presión interna con la del medio externo, por lo que la probabilidad de que se formen cristales de hielo en su interior es sustancialmente mayor.

El quasi equilibrio (enfriamiento rápido, 200°C/ min) y el congelamiento sin equilibrio (enfriamiento ultrarrápido, ~2500 °C / min) son alternativas al congelamiento equilibrado (Mazur, 1990).

Los métodos rápidos exitosos para embriones de ratón fueron desarrollados por primera vez por Rall y Fahy en 1985. Se han desarrollado métodos, altamente efectivos y fáciles de usar, tanto para los ovarios de ratón como para embriones (Rall y Fahy, 1985).

Los métodos rápidos se pueden dividir en dos categorías amplias: enfriamiento y vitrificación. Difieren principalmente en la composición y concentración del CP utilizado.

La vitrificación es una alternativa a los métodos convencionales de criopreservación. Es un procedimiento que usa elevadas concentraciones de CP a menudo 7 a 8 M, para garantizar que no se forme hielo en ninguna etapa, produciendo un incremento de la viscosidad. Es así que se mantiene la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación (Fahy y col., 1984; Fahy, 1986). La solución de vitrificación que contiene los agentes CPs está en contacto directo con las células y el nitrógeno líquido (Rall y

Fahy, 1985). Este proceso físico de solidificación se puede utilizar para conservar órganos, tejidos y embriones.

La estrategia de vitrificación es básicamente diferente a la estrategia de congelación tradicional. Una velocidad lenta de congelación intenta mantener un delicado balance entre varios factores, los cuales pueden resultar en lesiones celulares provocadas por la formación de cristales de hielo, los choques osmóticos, el efecto tóxico de los CPs, la concentración de electrolitos intracelulares, los daños por enfriamiento, las fracturas en la zona pelúcida y las alteraciones de los organelos intracelulares, el citoesqueleto o el contacto entre las células (Dobrinsky, 1996; Martino y col., 1996). La vitrificación elimina totalmente la formación de cristales de hielo ya que al aumentar la velocidad de congelación disminuyen los daños causados por el enfriamiento pasando rápidamente por el rango de temperatura de mayor peligro entre +15 a -5°C (Dobrinsky, 1996; Martino y col., 1996; Isachenko y col., 1997a; Isachenko y col., 1997b), (Tabla 2).

**Tabla 2.** Criopreservación lenta y vitrificación según características.

| Características                               | Procedimiento                           |   |
|---|---|---|
|   | Congelación lenta                       | Vitrificación                               |
| Tiempo de trabajo                             | Más de 3 horas                          | Rápido, menos de 10 minutos                 |
| Costo   | Elevado, requiere equipamiento especial | Reducido, no requiere equipamiento especial |
| Volumen muestra(l)                            | 100-250                                 | 1-2   |
| Concentración de CP                           | Baja                                    | Alta  |
| Riesgo de injuria                             | Alto                                    | Bajo  |
| Viabilidad post descongelación                | Alta                                    | Alta  |
| Riesgo de toxicidad del CP                    | Baja                                    | Alta  |
| Potencial contaminación con agentes patógenos | Baja                                    | Alta  |
| Dificultad de manipulación                    | Fácil                                   | Difícil                                     |

*Fuente Adaptado Jang y col., 2017.*

Generalmente los CPs utilizados son los mismos que en congelación lenta. La exposición a los CPs es de segundos a minutos, posteriormente el tejido es sumergido directamente en nitrógeno líquido. Esta es una ventaja de la técnica, ya que permite prescindir del uso de equipos de congelación programables. Sin embargo puede producir toxicidad durante la deshidratación en el medio CP. El mecanismo de toxicidad celular de los CPs puede

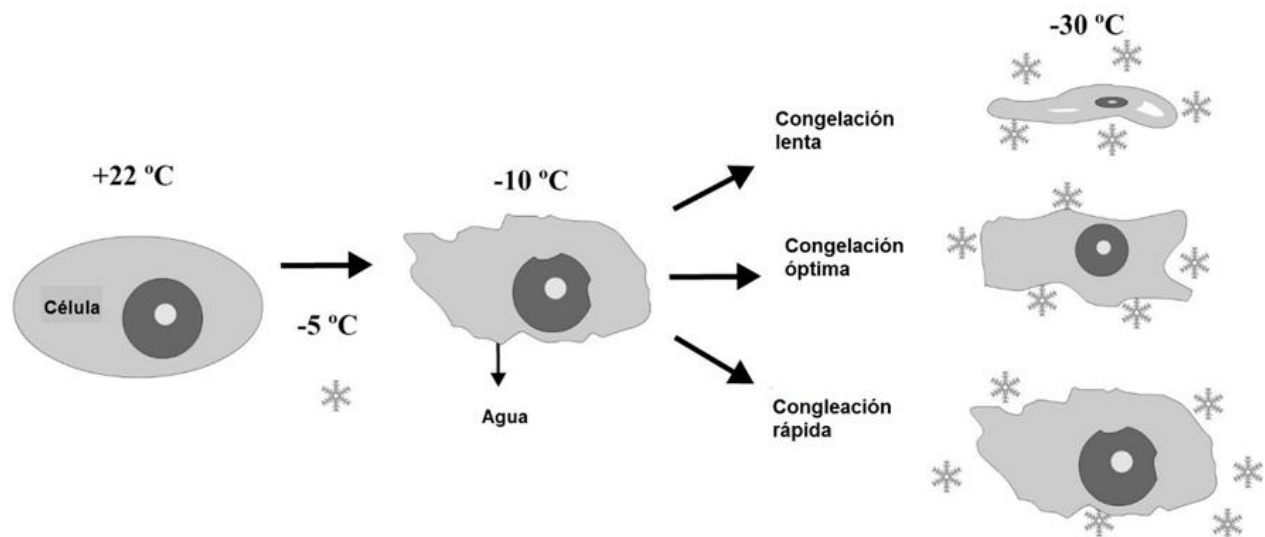


variar de un deterioro inespecífico de los componentes celulares (por ejemplo, ruptura de membranas, desnaturalización de proteínas) a una acción específica sobre distintas enzimas. El grado de toxicidad química está directamente relacionado a la concentración y temperatura de la solución de vitrificación, así como el tiempo de exposición de la muestra a la solución. Por estos motivos el proceso requiere un control preciso de la concentración de los CPs así como la temperatura y el tiempo (Sugimoto y col., 2000; Salehnia y col., 2002; Migishima y col., 2003; Yeoman y col., 2005).

Independientemente del método de criopreservación que se aplique o del tipo de material que se almacene, es vital que el material se conserve en condiciones óptimas. El material siempre debe mantenerse a temperaturas bajo cero y nunca debe ser parcial o totalmente descongelado. Una vez que la temperatura aumenta por encima de  $-140^{\circ}\text{C}$ , las moléculas comienzan a moverse y los cambios comenzarán a ocurrir en las muestras y a su alrededor. Las temperaturas superiores a  $-90^{\circ}\text{C}$  pueden dañar los embriones en segundos (Nakagata, 2002).

Si la congelación se hace en pajuelas la temperatura crítica se puede alcanzar en tan solo 5 segundos al aire. Si se aplica el material y procedimientos correctos de manipulación en congelación la vida útil del material generado será muy larga (Whittingham y col., 1977).

La técnica de descongelación tiene sus fundamentos en cambios de estado basados en principios físicos (temperatura), químicos (composición de los CPs) y biológicos (características celulares). La descongelación de las células debe ser muy rápida, para prevenir la formación de cristales en el momento que la temperatura cambia de  $-50^{\circ}\text{C}$  a  $0^{\circ}\text{C}$ , si el proceso se lleva a cabo lentamente causa daño celular y pérdida de viabilidad. Luego de descongeladas hay que realizar una serie de lavados para eliminar el CP ya que estos dañan las células (Figura 10).



**Figura 10.** Eventos físicos en las células según tipo de congelación equilibrada. Fuente adaptado Mazur, 1977.

## **Trasplante de ovario y vitrificación**

### **Antecedentes de la técnica**

El trasplante y la criopreservación de ovario se han estudiado básicamente en dos períodos de tiempo. Después del 1er. informe en 1940 sobre el TOv, se sucedieron una serie de trabajos realizados en ratón y rata con ovarios frescos y los primeros intentos de criopreservación lenta con glicerol como CP. La 2da. etapa se inicia en la década de 1990 con el surgimiento de congelación rápida y ultrarrápida y los tratamientos contra el cáncer en humanos, que visualizaron su aplicación para preservar gametos de mujeres infértiles (Carrol y Gosden, 1993; Anderson y col., 2008; Gosden, 2008; Silber y col., 2018).

El primer TOv ortotópico exitoso fue realizado por Robertson en 1940, en ratón. Pocos años después, Russell y Hurst del Laboratorio Jackson, publicaron su trabajo sobre el mantenimiento de cepas consanguíneas de ratón por TOv. En esta etapa la mayoría de los trabajos se centraron en optimizar la técnica de trasplante e identificar las dificultades en las diferentes especies. Stevens, 1957 modificó la técnica utilizando medio ovario, una variación que superó la mayoría de las dificultades en el éxito del injerto. Estas dificultades relacionadas con el tamaño del injerto podrían explicar algunas de las diferencias en los resultados reportados por los diferentes investigadores (Sztein, 1998).

Referido a la criopreservación, Parkes y Smith en 1954 realizaron los 1ros. ensayos utilizando el método de enfriamiento lento a  $-79^{\circ}\text{C}$  en presencia de un 15% de glicerol en cortes de 1 mm de ovario de rata. Mediante esta técnica se logró restaurar parcialmente la función cíclica, pero el ovario no pudo ser preservado por más de 44 días a esa temperatura. Usando el mismo protocolo, en el mismo año Deanesly crio preservó tejido relativamente más grande (la mitad de un ovario de rata) y observó que la región central no sobrevivía tan bien como la región periférica. Los estudios posteriores durante la década de 1950 se centraron en las tasas de establecimiento del injerto, la duración y el intervalo del ciclo estral después de la exposición a diversas concentraciones de glicerol a distintos tiempos de exposición (sin congelación) y tasas de enfriamiento. Green y col., 1956; Deanesly, 1957; Rall y Fhay, 1985, observaron una alta tasa de supervivencia de embriones de ratón tanto como con el método de enfriamiento lento y rápido utilizando como CP al VS1 altamente concentrado, sin embargo posteriormente fue reportado que a altas concentraciones produce malformaciones fetales (Migishima y col., 2006).

La segunda etapa corresponde al resurgimiento del interés por esta técnica en la década del 90 al reanudarse los trabajos de criopreservación. Trabajos sobre la viabilidad in vivo del tejido ovárico criopreservado fueron reportados por Carroll y Gosden, 1993. Estos investigadores congelaron folículos ováricos de ratón y examinaron el crecimiento in vitro de folículos frescos y congelados. Los folículos los trasplantaron ortotópicamente en ratones ovariectomizados y obtuvieron descendencia viva. Otro paso significativo fue el nacimiento de un cordero después del autotrasplante de cortes de tejido ovárico descongelado realizado por Gosden y col. en 1994. Harp y col, 1994 en el mismo año informó actividad esteroideogénica después del trasplante autólogo de ovario de ratón criopreservado, pero no hay datos sobre apareamiento y preñez.

A lo largo de esta etapa se sucedieron una serie de trabajos con diferentes cepas y stocks de ratón aplicando el método de congelación equilibrada: Cox y col., 1996; Gunasena y col., 1997; Sztejn y col., 1998.

Los ratones inmunodeficientes se han utilizado con éxito como animales modelos para la evaluación in vivo de xenoinjertos de tejido ovárico criopreservado de ovejas, gato, mono tití, elefante (Gosden y col., 1994; Candy y col., 1995; Gunasena y col., 1998). En la década del 2000, fueron publicados exitosos trabajos usando DMSO 1,5 M como CP principal en enfriamiento lento (0.3-0.5 ° C / min) (Candy y col., 2000; Shaw y col., 2000; Shaw y Trounson, 2002).

La vitrificación de ovarios fue reportada en roedores, animales domésticos, primates y humanos (Takahashi y col., 2001; Migishima y col., 2003; Wang y col., 2008). Su aplicación inicial fue en embriones de ratón que presentaron tan buena supervivencia como con la congelación lenta. También ha sido utilizada para preservar blastocistos y oocitos humanos (Rall y Fahy, 1985; Takahashi y col., 2005). Existen reportes en humanos de TOv frescos y criopreservados de corteza ovárica exitosos en 2004 y 2005 (Donnez y col., 2011).

Takahashi simplificó el método de vitrificación de Rall y Fahy (1985) con VS1 desarrollando el DAP213 a partir de VS1. Migishima, 2003 desarrolló un nuevo método de criopreservación de ovarios por vitrificación utilizando DAP213 como CP, modificando el protocolo de Nakagata. Aunque la toxicidad de DAP213 en células ováricas es desconocido, se ha obtenido un alto grado de viabilidad (Migishima y col., 2003).

En cuanto a la vitrificación de ovarios de líneas de ratones GM algunos investigadores han reportado descendencia viva después del alotrasplante ortotópico (Migishima y col., 2003; Hani y col., 2006, Migishima y col., 2006, Bagis y col., 2008).

La aplicación de esta técnica se fue incrementando en los últimos años cuando se logró obtener mejoras considerables, siendo utilizada principalmente para animales de laboratorio particularmente en cepas subfértiles o cuando no es posible o es ineficaz congelar embriones (Nakagata, 2002). En medicina humana actualmente tiene una importante aplicación en mujeres pre púberes que han sufrido tratamiento de quimioterapia y es un método robusto para restaurar también la función hormonal.

### **Trasplante de ovario-características**

Se han descrito 2 técnicas de TOv: el trasplante ortotópico en el cual se implanta el ovario sustituto en el lugar del ovario original y el trasplante heterotópico, donde la implantación del nuevo órgano se realiza fuera de su lugar normal, por ejemplo en el tejido subcutáneo o en la cápsula renal. Esta última técnica es de utilidad frecuente en humanos para restaurar el funcionamiento hormonal (Migishima y col., 2006). La técnica de TOv ortotópico ha sido bien descrita en el trabajo publicado por Jones y Krohn, 1960 y Nakagata, 2002.

El éxito del TOv depende de minimizar el rechazo del injerto y de una buena cirugía (Nakagata, 2002).

Las ratonas receptoras deben ser maduras sexualmente (3 a 4 meses) e histocompatibles con la donante. El tejido ovárico es significativamente menos inmunogénico que la piel, pero la mayoría de los injertos entre individuos no idénticos son rechazados. El tejido ovárico transporta antígenos de histocompatibilidad, y la bursa ovárica no es un sitio inmunológicamente privilegiado. Para superar los problemas de rechazo del trasplante, el receptor debe ser histocompatible con el donante o inmunológicamente comprometido. Si la donante tiene un transgen, puede ser rechazado por esta causa aunque la receptora sea de una cepa endogámica. Según Nakagata, 2002 el injerto puede ser efectivo en receptores inmunológicamente comprometidos.

Para asegurar la viabilidad del ovario es crucial el manejo de la cápsula ovárica y la revascularización del ovario durante la cirugía. La cápsula ovárica debe permanecer íntegra, al igual que los vasos del ovario trasplantado. La perfusión del tejido depende del crecimiento invasivo de los nuevos vasos sanguíneos y del endotelio vascular, así como de la oxigenación y reperfusión de nutrientes, ya que el TOv se realiza sin reanastomosis vascular. El tiempo que lleven estos acontecimientos es crítico para la supervivencia y longevidad de la funcionalidad del tejido ovárico. Los folículos primordiales pueden tolerar hasta 4 horas de isquemia, pero las células que rodean los folículos son más sensibles (Schmidt y col., 2003). Animales jóvenes son los utilizados con mayor preferencia, entre 8 y 12 días de edad ya que contienen el máximo número de folículos primordiales y estos son menos sensibles al daño que puede provocar la vitrificación debido a su pequeño tamaño y la ausencia tanto de zona pelúcida como de células granulosas, aumentando la permeabilidad a los CPs (Oktay y col., 2000; Shaw y col., 2000). Además por su metabolismo lento tienen mayor supervivencia en un ambiente isquémico. En contraste, los animales de mayor edad que ya presentan folículos secundarios, terciarios y pre ovulatorios presentan una pobre supervivencia después del descongelado ya que estos folículos son más sensibles al frío. Hani y col., 2006 obtuvo una viabilidad reducida en ovarios congelados y descongelados en animales donadores de 4 semanas, 10 semanas y 7 meses de edad, en comparación con donadoras de 10 días de vida.

Nakagata, 2002 afirma que se puede mejorar la revascularización del ovario implantado dejando un 10% del ovario de la receptora; sin embargo es factible que se produzcan gestaciones procedentes de folículos provenientes del 10% del ovario residual.

Muchos investigadores aplican esta sugerencia pero se debe monitorear genéticamente la progenie a no ser que la donadora tenga diferencias fenotípicas con la receptora que permitan identificar el origen de las crías. La extracción completa del ovario de la receptora es difícil de lograr, ya que existe una alta probabilidad de que quede algo de tejido remanente (Huang y col., 2010). Si solo se extrae un ovario el restante generalmente compensa esta pérdida (hipertrofia ovárica) liberando casi el doble de la cantidad normal de ovocitos. Como los embriones resultantes se implantan normalmente el tamaño de la camada de ratones con un solo ovario es comparable con el de hembras con dos ovarios funcionales. La restauración del ciclo estral en las receptoras se produce a las 2 semanas aproximadamente, momento en el cual se pueden colocar con machos fértiles (Nakagata, 2002).

## **Criopreservación de ovario- características**

Varias son las ventajas de la criopreservación del tejido ovárico: se puede extraer de animales recientemente muertos, la edad del donante es relativamente poco importante y es fácil de congelar. Si un ovario se corta en trozos se pueden generar varios reproductores por donante. En el caso de la vitrificación no necesita equipamiento específico y la técnica es muy rápida y sencilla (Cox y col., 1996; Gunasena y col., 1997; Sztein y col., 1998).

El método de congelación lenta está perfectamente estandarizado con resultados ampliamente exitosos sin embargo la vitrificación siendo más reciente ha obtenido resultados satisfactorios (Nakagata, 2002; Migishima, 2006).

La integridad metabólica y estructural del tejido ovárico criopreservado luego de la congelación y descongelación es crucial para lograr una foliculogénesis normal luego del trasplante (Nakagata, 2002; Huang y col., 2010).

Durante el proceso de descongelación puede ocurrir la desvitrificación. Para evitar este efecto, es necesario aumentar la tasa de descongelación ya sea utilizando ovarios pequeños (menores de 10 días) o cortando los ovarios en trozos más pequeños (Nakagata, 2002; Migishima y col., 2006).

Las desventajas de la criopreservación del tejido ovárico es que los protocolos de maduración y cultivo in vitro todavía necesitan optimización, deben ser trasplantados a receptoras histocompatibles o inmunológicamente comprometidos. Además los tejidos de un animal donante enfermo pueden transmitir enfermedades al receptor como infecciones virales o bacterianas, cánceres, entre otros (Nakagata, 2002).

## **Validación del ovario criopreservado**

La validación o evaluación del tejido criopreservado es necesaria para mejorar los protocolos de criopreservación en relación con la concentración de CPs, tiempo de equilibrio, velocidad de enfriamiento o descongelación y medio de descongelación.

La histología del tejido ovárico se ha aplicado para examinar la supervivencia del tejido inmediatamente después de descongelar o después del trasplante y la recuperación del injerto. Sin embargo, la ausencia de atresia folicular visible o del daño obvio del tejido intersticial no es una indicación confiable de la viabilidad adecuada del tejido ovárico descongelado. La evaluación histológica del tejido del ovario trasplantado también puede verse obstaculizada debido a la dificultad de discriminar el injerto del tejido ovárico del receptor in vitro y fundamentalmente en los casos que se deja el 10% del ovario de la hembra receptora. También hay que considerar que el tejido del injerto puede formar un "nuevo ovario" al mezclarse con los restos del ovario del huésped (Huang y col., 2010).

El desarrollo de los folículos extraídos del tejido ovárico descongelado es un método aplicado a menudo y se utiliza con más éxito en ratones que en otras especies de mamíferos. Esto puede deberse al tiempo relativamente corto de desarrollo folicular en esta especie y al pequeño tamaño de los folículos de los ratones en comparación con los de otras especies.

Los folículos primordiales de ratón en cultivo pueden ser activados y desarrollarse a etapas antrales. También pueden ser fertilizados con éxito en procedimientos de FIV para producir embriones viables (Liu y col., 2001; Liu y col., 2002; Hasegawa y col., 2006; Xu y col., 2009) y crías vivas posteriores a la transferencia (Liu y col., 2001, Hasegawa y col., 2006). Sin embargo, esto se refiere a la calidad de los folículos individuales, pero no a la viabilidad de todo el tejido ovárico.

La producción de descendencia viva a partir de receptores de tejido ovárico congelado-descongelado es de hecho la prueba definitiva del rendimiento reproductivo sostenido del injerto (Candy y col., 2000; Migishima y col., 2003, Migishima y col., 2006; Chen y col., 2006; Hani y col., 2006; Bagis y col., 2008).

### 3. OBJETIVOS

**Objetivo general:** Validar las técnicas de trasplante de ovario y vitrificación de ovario en ratonas triple transgénicas para enfermedad de Alzheimer para contribuir a crear un banco genético.

#### Objetivos específicos

- Poner a punto la cirugía de trasplante y vitrificación de ovario en un modelo 3x Tg
- Identificar el momento de recuperación de la actividad ovárica por citología vaginal en las receptoras según tipo de ovario trasplantado.
- Calcular la tasa de preñez en receptoras según tipo de ovario trasplantado.
- Identificar el promedio de días a la 1er camada post trasplante en receptoras según tipo de ovario trasplantado.
- Identificar el intervalo de días entre camadas.
- Calcular el promedio de crías por camada en receptoras según tipo de ovario trasplantado.
- Identificar la presencia de la modificación genética en las camadas procedentes de receptoras según tipo de ovario trasplantado.

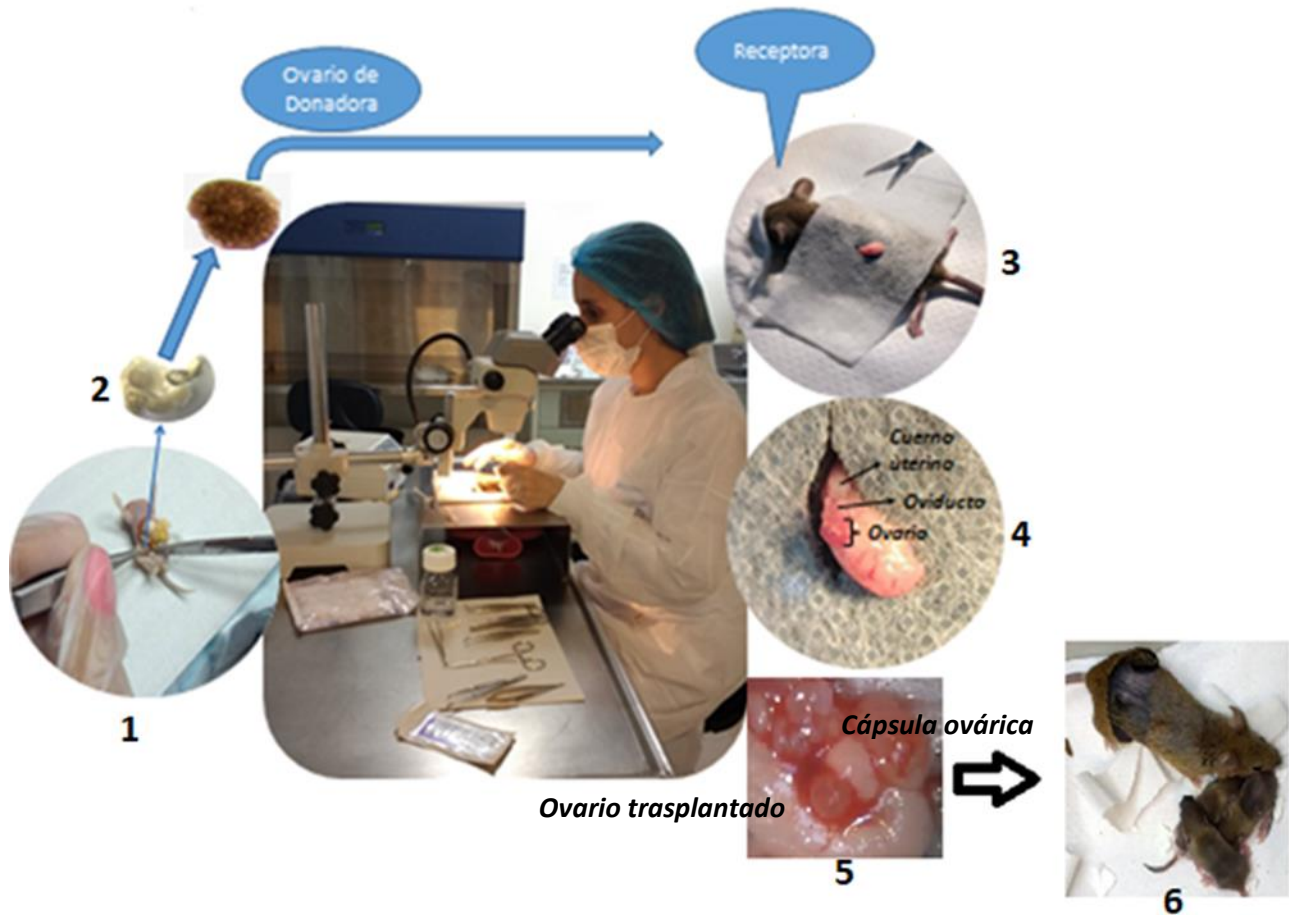
### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La aprobación de este proyecto fue realizada por el Comité de Ética Institucional de Cuidado y Uso de Animales del CUDIM (Nº 16091902). Los protocolos se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio. Las líneas de ratones fueron reproducidas y mantenidas en el bioterio del CUDIM en instalaciones libres de patógenos específicos, en condiciones ambientales estandarizadas: ciclos de luz/oscuridad 12:12, temperatura controlada  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , Humedad  $50\% \pm 10$  y con agua y alimento estéril ad libitum.

## **Prueba piloto**

Para poner a punto la cirugía de TOv se realizó en primera instancia una prueba piloto, trasplantando ovarios frescos en receptoras de descarte disponibles en el bioterio del CUDIM. La técnica aplicada fue la descrita por Jones y Krohn en 1960, aplicando la modificación sugerida por Nakagata, 2015 de dejar 10% del ovario de la receptora en la cápsula ovárica para favorecer la revascularización del ovario implantado.

Como en la prueba piloto, la primera camada nacida tuvo más del 74,0% de la descendencia no GM podría haber provenido del 10% del ovario residual, de la receptora, se decidió aplicar en el proyecto, la ovariectomía bilateral total en las receptoras, para evitar el posible efecto de dominancia. Otra modificación que se aplicó fue suprimir la compresión con pinzas de los vasos sanguíneos del ovario de la receptora, dejando formar un coágulo para favorecer el implante del ovario trasplantado. Los pasos de la técnica se pueden observar en la Figura 11.



**Figura 11.** Extracción de ovarios de donadora y técnica de TOv.

1= muestra la extracción de los ovarios de las donadoras; 2= ovario <10 días, luego de la disección bajo lupa, 3= se puede observar la receptora anestesiada con el ovario exteriorizado, 4= muestra el ovario/oviducto/cuerno uterino, 5= corresponde al ovario de la donadora dentro en la cavidad bursal de la receptora, luego de la ovariectomía, 6= hembra trasplantada con crías.

## Animales

Todos los animales utilizados para esta investigación correspondieron a la especie *Mus musculus*.

1) Grupo hembras donadoras de ovarios y machos reproductores:

Modelo de enfermedad de Alzheimer, línea triple transgénica: B6; 129-*Psen1<sup>tm1Mpm</sup>* Tg (APPSwe, tauP301L) 1Lfa/Mmjax (3x Tg -AD MMRRC stock #34830) procedente del Laboratorio Jackson de USA; modelo cedido por el Dr. Frank LaFerla Profesor y Decano de School of Biological Sciences y Director de, Alzheimer's Disease Research Center at the University of California, Irvine, USA.



Hembras donadoras de ovarios: n=20, <10 días de edad.

Machos reproductores: n=8, de 8-10 semanas de edad, con fertilidad probada.

## 2) Grupo Hembras receptoras:

Híbridos F2 (fondo genético del modelo transgénico): B6129SF/J ambas líneas procedentes del laboratorio Jackson de USA.

Hembras receptoras: n=18, de 8 a 10 semanas de edad, se dividieron en 2 grupos al azar: grupo 2.1. Receptoras trasplantadas con ovarios frescos, total 8 y grupo 2.2 receptoras trasplantadas con ovarios vitrificados, total 10.

### **Extracción de ovarios del donante**

Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Nakagata, 2002. Los donantes fueron sacrificados por decapitación.

Se desinfectó la piel del abdomen con alcohol 70%, varias veces con un intervalo de 3 a 4 minutos entre cada aplicación. En condiciones asépticas se realizó una incisión en la línea media del abdomen. Una vez abierta la cavidad abdominal se utilizó un segundo juego de instrumental. Se replegaron los intestinos y se expuso el tracto reproductivo. Siguiendo cada trompa uterina hacia el riñón se localizó la almohadilla de grasa/ovario/oviducto. Se extrajo todo el tracto reproductivo y luego se disecó el ovario en medio mWMM con agujas de calibre 26 bajo lupa marca NIKON modelo SMZ800 15x, Japón y se removió la grasa subyacente al ovario para su posterior trasplante o vitrificación según protocolo.

Se tomaron muestras para análisis genético de todas las donadoras para corroborar que portaban el transgen.

### **Protocolo de vitrificación y descongelación de ovarios**

Los ovarios fueron vitrificados según método descrito por Nakagata, 2015 con DAP213 (2 mol / l DMSO, 1 mol / l acetamida y 3 mol / l de propanodiol en medio PBI).

Previamente se prepararon 4 gotas de DMSO 1M, con el fin de realizar el lavado de los ovarios pasándolos de una gota a otra durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los ovarios se transfirieron a criotubos de 1 ml (Nalge Nunc International KK, Tokio, Japón) que contenían 5µL de 1 mol / l de DMSO en medio PBI. Los criotubos se colocaron en un enfriador Labtop 0°C (Nalge Nunc International KK, Tokio, Japón) durante 5 min, y se agregó a cada criotubo 95 µL de DAP213 mantenidos a 0°C por 5 min. Después de la exposición a DAP213, los criotubos se sumergieron directamente en nitrógeno líquido y se almacenaron en criostatos a -196°C.

La descongelación de los ovarios se realizó retirándolos del tanque de Nitrógeno líquido y dejándolos 30 segundos a temperatura ambiente. Se le agregó al criotubo 0,9 ml de medio PBI con 0,25 mol / l de sacarosa mantenida a 37 ° C, pipeteando el contenido sin burbujear por 5 minutos. Transcurrido ese tiempo cada ovario fue transferido a una placa de Petri adicionando 0,4 ml más de la solución de sacarosa e incubándolos a estufa de CO2 a 37°C por 5 minutos. Posteriormente fueron lavados en una placa de Petri conteniendo 3 gotas de medio KSOM/AA que fueron incubadas previamente por 30

minutos en la estufa de CO<sub>2</sub>. Cada ovario fue pasado por cada gota durante 10 minutos en estufa de CO<sub>2</sub>.

### **Procedimiento de trasplante de ovario**

La ovariectomía bilateral de las receptoras y el TOv se realizó de acuerdo al protocolo de Jones y Krohn, 1960 con modificaciones descritas en la prueba piloto. Para la cirugía las hembras se anestesiaron por vía i/peritoneal con una mezcla de ketamina (50mg/kg), xilacina (5mg/kg) y acepromacina (0,75mg/kg) diluida en fosfato buffer salino. 10 minutos antes de la anestesia se les administró un analgésico: Tramadol 3 mg/Kg por vía subcutánea. La dosis se repitió cada 7 horas en caso de manifestaciones de dolor.

Toda la cirugía se realizó en condiciones asépticas y bajo lupa NIKON modelo SMZ645, Japón, en aumento 15x. Se realizó una pequeña incisión dorso lateral en cada flanco a la altura de la ubicación del ovario. Al realizar el corte del músculo se pudo visualizar la almohadilla de grasa ovárica. Cada ovario fue expuesto fuera de la cavidad tirando de la almohadilla con una pinza roma. Se rotó el tejido hasta que el ovario quedó claramente visible. Previa identificación de los vasos que irrigan el ovario para no dañarlos, con una tijera de miniature, long handle, 6mm blade de micro cirugía se hizo una pequeña hendidura en la grasa que rodea la bolsa ovárica para sacar el ovario de la cápsula, teniendo sumo cuidado de preservar la integridad de la cápsula. Se extirpó la totalidad de cada ovario de la receptora (ovariectomía bilateral) y se sustituyó cada ovario por un ovario fresco o vitrificado de las donantes 3x Tg, según protocolo. Cada ovario fue colocado dentro de su respectiva bolsa ovárica y cubierto por la cápsula de la receptora, presionando con pinza roma. El ovario fue introducido dentro de la cavidad y el músculo fue suturado en u continua con ethicon reabsorbible 5.0 y la piel cerrada con cianocrilato.

### **Determinación de la ciclicidad, apareamiento y evaluación de la preñez**

El monitoreo de la recuperación de la actividad ovárica se realizó por colpocitología vaginal según técnica descrita por McLean y col., 2012. Se comenzó a los 7 días post cirugía, y en caso de no haber presentado ningún ciclo se repitió el control a los 15 y 21 días post cirugía. Las receptoras con actividad cíclica se comenzaron a servir con machos 3x Tg con fertilidad probada entre las 2 y 3 semanas post cirugía. La monta fue confirmada por la presencia de tapón vaginal en las primeras horas de la mañana del día siguiente al apareamiento. La preñez se diagnosticó mediante la observación de distensión abdominal y se registró fecha de parición, número de crías/camada, intervalo interpartos. A las hembras que no quedaron preñadas, se les realizó nuevamente citología vaginal entre los 28 y 30 días del apareamiento. Las hembras que no presentaron ciclos y/o no se detectó preñez transcurridas 16 semanas se consideró que el trasplante no fue exitoso y fueron sacrificadas por dislocación cervical y por necropsia se evaluó la estructura del tejido ovárico con lupa NIKON modelo SMZ800, Japón.

A las hembras con implantes exitosos se les permitió parir hasta 3 camadas. Al destete de la 3er camada las receptoras fueron sacrificadas por dislocación cervical y los ovarios fueron extraídos para su evaluación.

## **Identificación de la presencia de los transgenes APP, Tau y mutaciones en Psen**

Para identificar la presencia del triple transgen en las camadas paridas por las receptoras y en las hembras donadoras de ovarios se realizó análisis genético por PCR a partir de muestras obtenidas de las orejas y cola respectivamente, en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Química, Universidad de la República.

El ADN se extrajo de tejido con kit Pure Link Genomic DNA minikit (Invitrogen).

La determinación del transgen APP, se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers y condiciones sugeridos por laboratorio Bioartic.

La determinación de transgenes Tau se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers y condiciones sugeridos por Jackson Laboratory.

Las mutaciones en Psen1 se analizaron mediante PCR\_RFLP (con primers y condiciones sugeridos por Jackson Laboratory).

Se utilizó controles positivos y negativos en todas las determinaciones.

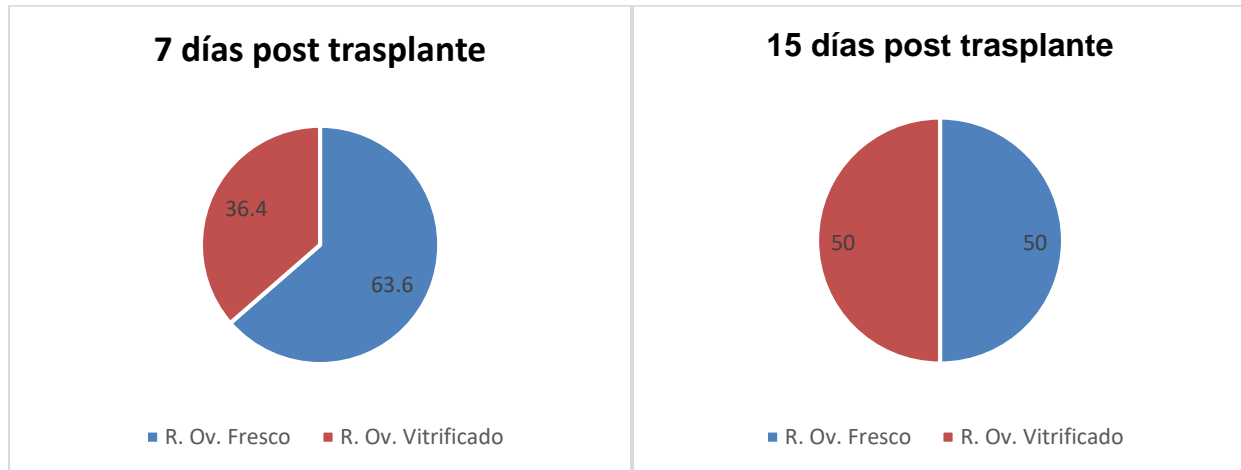
Se calculó un indicador de eficiencia reproductiva, el cual se definió como el N° de crías 3x Tg/ N° total de ovarios 3x Tg trasplantados /100.

### **Análisis de los datos**

Los resultados se presentan en tablas y gráficos. Se calcularon los promedios de los parámetros de estudio y el intervalo de confianza (IC). El análisis estadístico de los grupos se realizó por el test no paramétrico de chi cuadrado y test exacto de Fisher con el programa SPSS 22.0. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor p fue < a 0,05.

## 5. RESULTADOS

Un total de 18 receptoras recibieron TOv bilateral; 8 con ovarios frescos y 10 con ovarios vitrificados. A los 7 días post trasplante el 61% de las receptoras presentó ciclicidad y a los 15 días el 77,8%, en las siguientes figuras se observa la distribución de receptoras ciclando a los 7 y 15 días según tipo de ovario trasplantado.



**Figuras 12 y 13.** Distribución del total de receptoras ciclando a los 7 y 15 días según tipo de trasplante. R= receptora, Ov= ovario

En la tabla 3 se pueden observar las diferentes etapas del ciclo estral (CE) de las receptoras según tipo de trasplantes a los 7 y 15 días post cirugía.

**Tabla 3.** Citología vaginal de hembras trasplantadas a los 7 y 15 días según tipo de ovario.

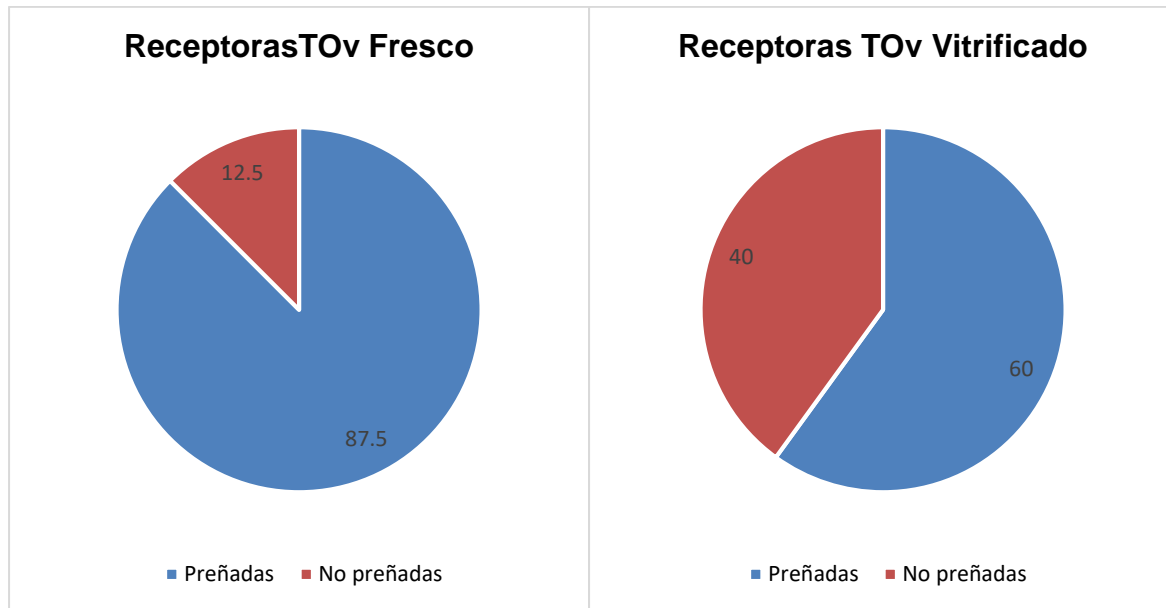
| Etapas del CE | 7 días post cirugía       |                     | 15 días post cirugía      |                     |
|---------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
|               | Receptoras/<br>Ov frescos | Receptoras/<br>Ov/v | Receptoras/<br>Ov frescos | Receptoras/<br>Ov/v |
| Proestro      | 2/8                       | 3/10                | 2/8                       | 2/10                |
| Estro         | 5/8                       | 1/10                | 2/8                       | 3/10                |
| Diestro       | 0/8                       | 0/10                | 1/8                       | 1/10                |
| Metasestro    | 0/8                       | 0/10                | 2/8                       | 1/10                |
| Anestro       | 1/8                       | 6/10                | 1/8                       | 3/10                |

Ov = ovarios, v= vitrificados

La colpocitología realizada a los 7 días post trasplante mostró que el 87,5% (7/8) de las receptoras de ovarios frescos y 40,0% (4/10) de las receptoras de ovarios vitrificados estaban ciclando. A los 15 días el total de las receptoras trasplantadas con ovarios frescos mantuvieron su porcentaje de actividad ovárica y las trasplantadas con ovarios

vitrificados llegaron a 70,0% (7/10). Las 4 hembras que no presentaron actividad ovárica, continuaron sin ciclar a los 21 días.

Del total de hembras que se identificaron ciclando según tipo de ovario las tasas de preñez para las de ovarios frescos y vitrificados fueron de 87,5% y 60,0%, representando el éxito del trasplante.



**Figuras 14 y 15.** Distribución de las receptoras según resultado de preñez por tipo de ovario trasplantado.

El promedio de días desde la cirugía hasta la parición de la primera camada fue de 38 y 42 días según tipo de ovario fresco o vitrificado respectivamente. El promedio de crías obtenidas por camada fue 6 (rango 2-8) con ovarios frescos y 4 (rango 1-7) con ovarios vitrificados. El promedio de días entre camadas para ambos protocolos fue de 28 a 34 días. La distribución de los parámetros reproductivos se muestra en la tabla 4. Ninguno de los parámetros mostró diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 4.** Distribución de los parámetros reproductivos de las receptoras según tipo de ovario trasplantado.

| <b>Parámetros</b>                    | <b>Ov. Fresco</b>  | <b>Ov. vitrificado</b> | <b>Valor p</b> |
|--------------------------------------|--------------------|------------------------|----------------|
| Nº de Receptoras                     | 8                  | 10                     | N/C            |
| Nº de H preñadas                     | 7                  | 6                      | 0,3137         |
| X de días a la 1er camada            | 38 (IC:31,5-42,5)  | 42 (IC:35,8-48,2)      | 0,99873        |
| X tamaño de camada                   | 6 (IC: 0,83-11,2)  | 4 (IC: 0,27-7,7)       | 0,99999        |
| X de intervalo en días entre camadas | 28 (IC: 24,3-31,8) | 34 (IC:32,6-35,4)      | 0,988793       |
| PCR                                  | 90/126 (71,4%)     | 0/72                   | N/C            |

Ov. = ovario, IC= intervalo de confianza

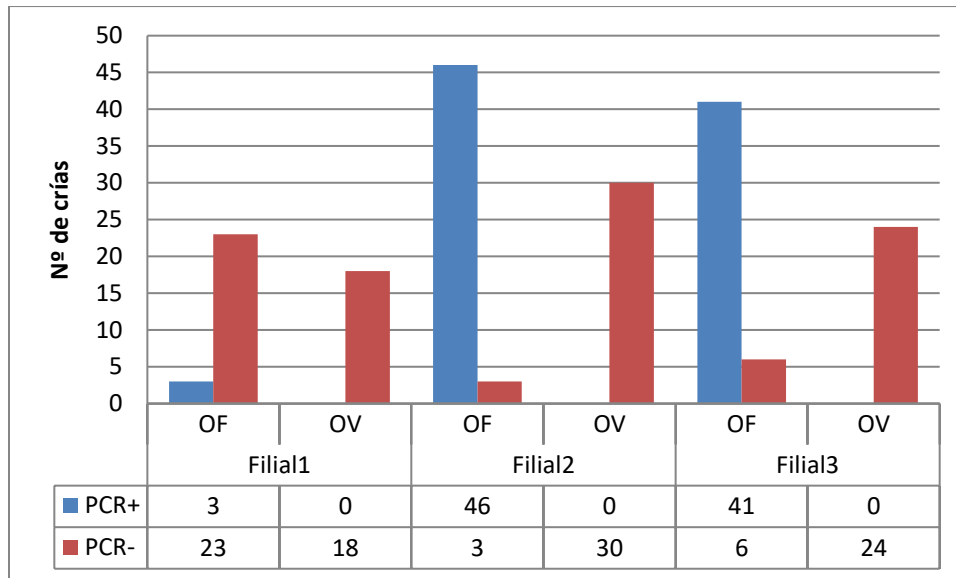
El 100, 0% de las receptoras con TOv frescos exitosos tuvieron 3 camadas y el 85, 7% de las trasplantadas con ovario vitrificado.

Los promedios de crías por camada por filial según receptoras de ovarios frescos y vitrificados fue menor en la primera camada, aumentando en la 2da y algo menor en la 3ra.

Todas las receptoras de ovarios frescos dieron crías GM; la proporción de crías GM fue 71,4%. La probabilidad de tener cría GM en la 1er filial fue de 11,5%; en la 2da 93,9% y en la 3ra. 87,2%. El indicador de eficiencia reproductiva de las hembras trasplantadas con Ov fresco fue 56,2%.

En cuanto a las receptoras de ovarios vitrificados no tuvieron crías GM.

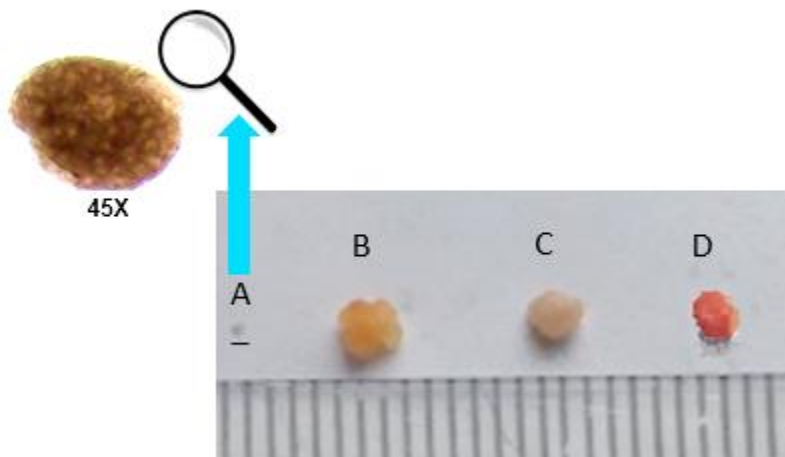
La distribución de las camadas por filial según análisis genético se muestra en la figura 16.



**Figura 16.** Distribución de crías por filial según tipo de receptora y análisis genético.

OF = ovario fresco; OV= ovario vitrificado.

La necropsia de las receptoras permitió analizar la evolución de los ovarios trasplantados. En la figura 17 se pueden observar las características de los ovarios de donadoras < de 10 días y su tamaño en comparación con el de una hembra en edad reproductiva (B). Los ovarios C y D vitrificados y frescos respectivamente, alcanzaron un desarrollo similar al de las hembras 3x Tg en edad reproductiva, luego del trasplante (2,1 a 2,8 mm<sup>3</sup>).



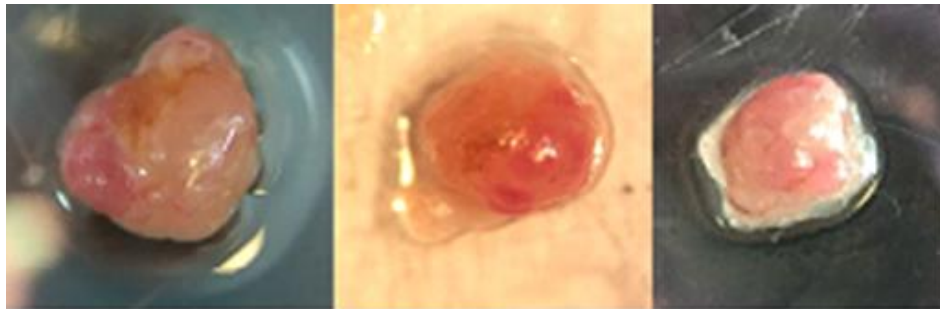
**Figura 17.** Ovarios 3x Tg según procedencia.

A= Ovario de hembra 3xTg < de 10 días, B= Ovario de hembra 3xTg 8 a 10 semanas, C= Ovario trasplantado vitrificado, D= Ovario trasplantado en fresco.

El total de ovarios trasplantados fue 36 (20 vitrificados y 16 en fresco). En TOv vitrificado 9 injertos tuvieron éxito y en fresco 12.

En 73% de las receptoras con TOv fresco el injerto exitoso fue bilateral y en las TOv con ovarios vitrificados el 48%.

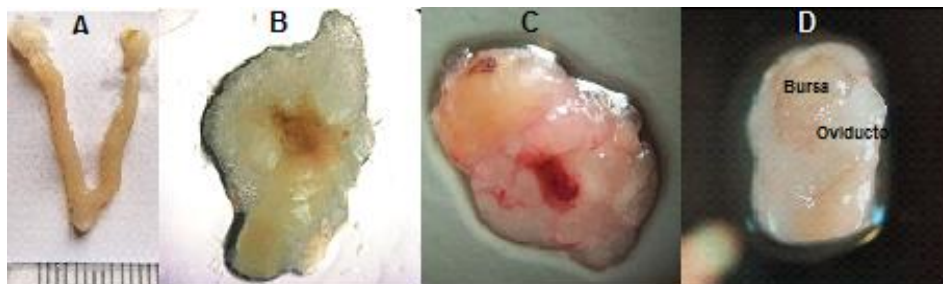
El análisis de los ovarios de las receptoras con trasplante exitoso mostró actividad folicular, folículos de tamaño considerable con coloración hemorrágica y cuerpos lúteos diferenciados como se observa en la figura 18.



**Figura 18.** Evolución de los ovarios trasplantados con éxito (15x).

El tamaño de los ovarios en las hembras que se observó un solo ovario exitoso su tamaño fue 0,8 a 1,5 mm mayor que las que tuvieron desarrollo de los dos ovarios.

Las hembras que no quedaron preñadas, así como las que no ciclaron no presentaron cambios en las colpocitologías. Los resultados de las necropsias a las 16 semanas mostraron ausencia de tejido ovárico en la cavidad bursal o en algunos casos una pequeña porción de tejido con ausencia de folículos o cuerpos lúteos. El útero presentó coloración pálida y poco desarrollo (Figura 19).



**Figura 19.** Aspecto de los ovarios trasplantados no desarrollados (15x).

*A= Trasplante sin éxito, útero con poco desarrollo y ausencia de ovarios. B= Ausencia de tejido ovárico dentro de la cavidad bursal. C y D= Ovarios en regresión, ausencia de cuerpo lúteo y folículos.*



## 6. DISCUSIÓN

La criopreservación de ovarios como medio para preservar líneas de ratón aún no se utiliza de forma rutinaria y solo unas pocas instalaciones ofrecen este servicio, aunque la tecnología ya ha demostrado su eficacia. La criopreservación de líneas con fines de conservación permite aplicar los principios éticos de las 3 R's y cumpliendo con dicha obligación. Aunque los animales donantes y receptores no pueden ser reemplazados en el material criopreservado, se puede minimizar el número utilizado y promover el bienestar animal.

El TOv ortotópico de ovarios frescos y criopreservados por congelación lenta en líneas de ratón ha sido ampliamente reportado (Cox y col, 1996; Gunasena y col, 1997; Sztejn y col, 1998, 1999; Candy y col, 2000; Shaw y Trounson, 2002). Sin embargo la aplicación del método de vitrificación es más reciente y ha mostrado resultados comparables (Takahashi y col., 2001; Migishima y col., 2003; Chen y col., 2006; Courbiere y col., 2006; Wang y col.; 2008; Youm y col., 2014). Esta técnica se destaca por ser fácil, rápida y de bajo costo para conservar gametos femeninos, permitiendo recuperar líneas a partir de animales envejecidos o recientemente muertos (Takahashi, 2001; Dawes y col., 2010), así como comenzar líneas libres de patógenos específicos, facilitar el intercambio de líneas entre laboratorios transfiriendo el material congelado en lugar de enviar animales vivos. También es una alternativa en líneas que no responden bien a la superovulación y por lo tanto no se puede realizar trasplante embrionario (Nakagata 2002). En el caso de países como el nuestro que no cuentan con accesibilidad a repositorios a diferencia de los países desarrollados es una valiosa posibilidad de preservar las líneas de uso común y poder refrescar el pie de cría y stocks de fundación.

En esta investigación se implementó el protocolo Jones y Krohn, 1960 quien afirmaba que el éxito del trasplante dependía en gran medida de una correcta hemostasia para la fijación del injerto, sin embargo con la práctica se pudo corroborar que el sangrado permite la formación de un coágulo que favorece la revascularización, actuando como cama del injerto. Huang y col., 2009 indicó que la revascularización es un factor determinante para el éxito del trasplante, ya que puede proporcionar factores angiogénicos, de crecimiento endotelial vascular, y de fibroblastos. Soleimani y col, 2010 demostró que el número de vasos sanguíneos presenta una correlación positiva con la supervivencia del injerto y de los folículos, además informó que la isquemia inevitable que sufre el ovario posterior al trasplante es más dañino que el producido por la exposición al frío, aunque el daño provocado por el frío reduce la vascularización del tejido. Muchos autores también han realizado implante de medio ovario o solo corteza a fin de asegurar una buena vascularización sobre todo en ovarios de animales de mayor porte. Eimani y col., 2008 plantea otra alternativa para mejorar la revascularización mediante dos incisiones en el ovario donante sin que las porciones del tejido se separen completamente. Nakagata, 2015 y otros investigadores dejan un 10% del ovario de la receptora para favorecer la revascularización, sin embargo esta medida tiene como inconveniente que aumenta la probabilidad de obtener descendencia del ovario residual. Este hecho lo comprobamos al realizar la prueba piloto con medio ovario remanente de la receptora y se obtuvo como resultado 74% de descendencia procedente del ovario residual; sin embargo en nuestro trabajo a pesar de realizar la extracción completa de

los ovarios de la receptora se obtuvo descendencia no GM que podría proceder de algún vestigio del ovario residual ya que la extracción completa es muy difícil de garantizar debido a su anatomía.

Otro elemento fundamental a tener en cuenta en la cirugía es la integridad de la cápsula ovárica de la receptora, siendo esta un determinante importante para el éxito del implante, ya que ha sido reportado que alteraciones en la cápsula de ovarios trasplantados que presentaron buen desarrollo y morfología normal no generaron descendencia (Huang y col, 2010). En nuestro estudio no observamos alteraciones de la cápsula.

Los resultados obtenidos en las colpocitologías vaginales realizadas a los 7 días post cirugía demostraron ciclicidad en la mayoría de las receptoras, coincidiendo con los resultados obtenidos por Nakagata, 2002 y Huang y col., 2010. Otros autores han reportado el comienzo de la ciclicidad entre 10 y 15 días (Cox y col 1996; Candy y col., 1997; Liu y col., 2002), estas diferencias se pueden deber a factores multicausales como: el método de criopreservación, las características propias de cada línea de ratón, la edad de la receptora y de la donadora, entre otros. Posiblemente en nuestro trabajo un elemento favorecedor haya sido la ovariectomía bilateral que ocasiona un aumento de las concentraciones de gonadotropinas en la circulación. Ese aumento provee el estímulo para acelerar el desarrollo de los ovarios inmaduros de las donantes (Cox y col., 1996).

Las receptoras con TOv vitrificado, demoraron más días en comenzar a ciclar o presentaron ciclos irregulares como observaron otros investigadores (Nakagata, 2002; Huang y col, 2010).

La tasa de preñez en el grupo de las receptoras con TOv vitrificados fue menor en relación al obtenido en el grupo de TOv frescos, aunque las diferencias no fueron significativas. Estos resultados son coincidentes con los reportados por otros autores como Candy y col, 2000; Chen y col., 2006; Migishima y col., 2003. Huang y col., 2010 concluyó que durante la vitrificación un alto porcentaje de folículos se pierden, esto puede explicar la reducción de la tasa de preñez en hembras con trasplante vitrificado. Chen y col., 2006 estudió el daño producido en los folículos como consecuencia de la vitrificación, encontró un  $59,6 \pm 7,1$  % de folículos primordiales viables y un  $83,0 \pm 2,8$  % de folículos primordiales con morfología normal luego de ser sometidos a vitrificación, sin embargo los folículos primordiales fueron los menos afectados en relación a los primarios y secundarios. Eimani y col., 2008 reportó que la muerte celular se produce en las células de la granulosa y el estroma, más que en los folículos primordiales.

Las receptoras que tuvieron un solo injerto exitoso mostraron desarrollo folicular y actividad hormonal suficiente para ciclar y gestar en las mismas condiciones que las hembras con 2 ovarios funcionales. Esto podría explicarse por lo reportado por Nakagata, 2002 quien indica que cuando se remueve un solo ovario el homólogo se hipertrofia para compensar la pérdida del mismo, produciendo el doble de ovocitos que el número normal. Los embriones se implantan con normalidad y el número de crías que se obtuvieron fueron comparables con las receptoras con dos ovarios funcionales. Resultados similares fueron reportados por Huang y col, 2010 quien utilizó un protocolo de trasplante unilateral.

El promedio de días entre la cirugía y la obtención de la primera camada no mostró diferencias significativas en hembras con TOV fresco o vitrificado. Sztejn y col., 1999 reportó cifras similares en receptoras con TOVs frescos y menor tiempo en las trasplantadas con ovarios criopreservados por congelación lenta. Huang y col., 2009 en hembras de diferente fondo genético trasplantadas con ovarios de donadoras GM obtuvo la 1er camada a los 2.9 meses en fondo C57BL / 6 (rango de 1.3 a 5.5 meses), 1.8 meses en FVB (rango de 1.0 a 2.5 meses) y 3.1 meses en BALB / c, hecho que permite apreciar las diferencias que se pueden ocasionar dependiendo de esta variable.

El promedio de crías por camada se redujo en receptoras con TOVs vitrificados en relación a las de TOVs frescos. Similares resultados han sido obtenidos por diversos autores (Chen y col., 2006, Migishima y col., 2003). Por otra parte Huang y col., 2009 en una cepa transgénica con fondo genético C57BL/6 no obtuvo diferencias significativas entre el promedio de crías por camada entre las provenientes de receptoras con TOV fresco y vitrificado (3.0 y 3.2 crías respectivamente). El promedio de crías por camada fue menor en la 1er. filial tanto en receptoras con TOV frescos como vitrificados. Esto podría deberse al tiempo que demoraron los folículos en desarrollarse, aumentando el número de estos en función del tiempo de realizada la cirugía. Las diferencias reportadas pueden deberse a variaciones inherentes a cada línea de ratón, ya que todos han trabajado con diferentes modelos y es real que fisiológicamente el tamaño de las camadas independientemente de las líneas va descendiendo a partir de la 3ra. generación.

Todas las receptoras con TOVs frescos exitosos tuvieron descendencia GM en sus camadas, sin embargo las receptoras con TOVs vitrificados no tuvieron descendencia GM. El porcentaje de crías GM obtenido fue 71,4% resultados similares fueron reportados por Migishima y Hani utilizando fondo genético C57BL/6.

En esta investigación los resultados obtenidos en ambos grupos indican que el desarrollo del ovario implantado y de los folículos se logró sin inconvenientes, ya que un alto porcentaje de receptoras lograron producir descendencia. La dificultad en obtener crías GM a partir de ovarios vitrificados puede deberse a múltiples factores. Según Nakagata, 2002 aunque la receptora sea histocompatible con la donante existe la posibilidad de que al utilizar donantes GM el ovario trasplantado actúe como un antígeno, la alternativa a este inconveniente es el uso de receptores de cepas inmunocomprometidas como nude, NIH III, SCID, entre otras. Otro factor influyente es la toxicidad del CP utilizado (DAP213) cuya magnitud permanece desconocida (Migishima y col., 2003; Hani y col., 2006). El método de vitrificación requiere de altas concentraciones de los crioprotectores lo cual aumenta la toxicidad, pudiendo tener efectos adversos en los ovocitos como la confusión del huso, el endurecimiento de la zona pelúcida e inclusive la muerte celular. La gravedad del efecto tóxico varía en función del tiempo de exposición al CP, la temperatura, la velocidad con la que se llega a  $-196^{\circ}\text{C}$  y el tamaño de las células. También hay que considerar la estabilidad de las mutaciones que si bien en este modelo ha mostrado ser estable en la reproducción natural, puede haberse visto afectada por el proceso de vitrificación.

El análisis de la bibliografía existente no muestra resultados con modelos triples transgénicos y permiten observar una gran variación en los resultados reportados con

una sola modificación genética en diferentes fondos genéticos. Migishima, 2003 y Hani, 2006 en receptoras trasplantadas con ovarios vitrificados de líneas transgénicas con fondo genético C57BL/6 obtuvieron 48,5% y 44% de crías GM respectivamente. Por su parte Huang, 2009 en 22 líneas GM con 3 fondos genéticos diferentes, reportó descendencia entre 2 y 49% en fondos C57BL/6; en FVB 3% y BALB/c 15%; no pudiendo obtener descendencia GM en dos líneas, una con fondo C57BL/6 y otra FVB. Además observó la mayor probabilidad de tener descendencia GM en la primera camada con una proporción de 43.1%, y descendió en la segunda, tercera y cuarta camada a 29.3%, 20.7% y 6.9% respectivamente. Estos resultados muestran claramente una gran variabilidad dependiente del tipo de modificación genética y que la probabilidad de obtener crías GM es menor en las receptoras con TOv vitrificado.

Puede haber diferentes efectos sobre la funcionalidad del TOv vitrificado o modificación genética o ambos a largo plazo, se necesitan más estudios para investigar estos efectos, para seleccionar la mejor combinación de procedimientos que logren una vitrificación ovárica eficiente. A tales efectos, dejamos planteadas posibles hipótesis sobre factores que pueden haber afectado el resultado como: el método de vitrificación utilizado, la toxicidad del CP, las modificaciones genéticas de la línea y su estabilidad.

## **7. CONCLUSIONES**

El trasplante y la vitrificación de ovario es una técnica sencilla, rápida, de bajo costo y de amplia aplicación para almacenar material genético valioso de modelos de ratón. Si bien en relación a los animales GM es necesario profundizar para conocer los determinantes que actúan alterando la transmisión de las modificaciones genéticas, dado los diferentes resultados que se obtienen dependiendo de los fondos genéticos y de la tecnología aplicada.

Esta metodología es una herramienta para la generación de bancos genéticos que completa la criopreservación de espermatozoides y el trasplante de embriones.

En nuestro medio al no tener fácil acceso a repositorios y por el alto costo de los modelos representa una herramienta valiosa para los investigadores ya que permitiría preservar y garantizar la disponibilidad de líneas comúnmente utilizadas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Allen E. (1922) The oestrus cycle in the mouse. *Am J Anat*; 30:297–371. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aja.1000300303>. Fecha de consulta 18/10/19.
- 2) Anderson, R.; Wallace, W.; Baird, D. (2008) Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes. *Reproduction*; 136:681-689. Disponible en: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/136/6/681.xml>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 3) Bagis, H.; Akko, T.; Taş, A.; Aktopraklıgil, D. (2008) Cryogenic effect of antifreeze protein on transgenic mouse ovaries and the production of live offspring by orthotopic transplantation of cryopreserved mouse ovaries. *Mol Reprod Dev*; 75:608-613. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrd.20799>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 4) Balakier, H.; Zenzes, M.; Wang, P.; Neil, J.; MacLusky, R.; Casper, R. (1991) The effect of cryopreservation on the development of S- and G2 phase mouse embryos. *J Assist Reprod Genet*; 8:89–95.
- 5) Ball, M.; Hachinski, V.; Fox, A.; Kirshen, A.; Fishman, M.; Blume, W.; Krai, V.; Merskey, H. (1985) A new definition of Alzheimer's disease: A hippocampal dementia. *Lancet*; 82: 4531-4534.
- 6) Balls, M. (2002) Future improvements: replacement in vitro methods. *ILAR J*; 43:69-73. Disponible en: [https://academic.oup.com/ilarjournal/article/43/Suppl\\_1/S69/756985](https://academic.oup.com/ilarjournal/article/43/Suppl_1/S69/756985). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 7) Benavides, F.; Guenet, J. (2004) Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones. Alcalá de Henares, Ed. Universidad de Alcalá de Henares, 310 p.
- 8) Billings, L.; Oddo, S.; Green, K.; McGaugh, J.; LaFerla, F. (2005) Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*; 45:675-88. Disponible en: [https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(05\)00078-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627305000784%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(05)00078-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627305000784%3Fshowall%3Dtrue). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 9) Byers, S.; Wiles, M.; Dunn, S.; Taft, R. (2012) Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLOS ONE*; 7(4):e35538. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/224709312\\_Mouse\\_Estrous\\_Cycle\\_Identification\\_Tool\\_and\\_Images](https://www.researchgate.net/publication/224709312_Mouse_Estrous_Cycle_Identification_Tool_and_Images). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 10) Candy, C.; Wood, M.; Whittingham, D. (1995) Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod*; 10:2334-2338.

- 11) Candy, C.; Wood, M.; Whittingham, D. (1997) Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J. Reprod. Fert*; 110:11–19. Disponible en: [https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/110/1/jrf\\_110\\_1\\_002.xml](https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/110/1/jrf_110_1_002.xml). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 12) Candy, C.; Wood, M.; Whittingham, D. (2000) Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod*; 15:1300-1304. Disponible en: <https://academic.oup.com/humrep/article/15/6/1300/2915565>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 13) Carroll, J.; Gosden, R. (1993) Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod*; 8:1163-1167. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.515.9188&rep=rep1&type=pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 14) Chen, S.; Chien, C.; Wu, M.; Chen, T.; Lai, S.; Lin, C.; Yang, Y. (2006) Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod*; 21:2794-2800. Disponible en: <https://academic.oup.com/humrep/article/21/11/2794/2939140>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 15) Choi, J.; Huang, H.; He, X. (2015) Improved low-CPA vitrification of mouse oocytes using quartz microcapillary. *Cryobiology*; 70: 269–272.
- 16) MGAP. CNEA. (2014) Comisión nacional de experimentación animal. Informe-Pautas-Perspectivas/2010-2014. Montevideo, Uruguay, Ed. Glenur SA. 95 p. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/libro\\_cenea.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/libro_cenea.pdf). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 17) Cook, M. (1965) *The Anatomy of the Laboratory Mouse*, Maine, Ed. Academic Press, 143 p.
- 18) Courbiere, B.; Odagescu, V.; Baudot, A.; Massardier, J.; Mazoyer, C.; Salle, B.; Lornage, J. (2006) Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow cooling protocols. *Fertil Steril*; 86:1243–1251. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(06\)01308-2/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(06)01308-2/fulltext). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 19) Cox, S.; Shaw, J.; Jenkin, G. (1996) Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*; 107: 315–322. Disponible en: [https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/107/2/jrf\\_107\\_2\\_021.xml](https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/107/2/jrf_107_2_021.xml). Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 20) Critser, J.; Russell, R. (2000) Genome resource banking of laboratory animal models. *ILAR J*; 41: 183-186. Disponible en: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/41/4/183/716540>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 21) Cunliffe-Beamer, T. (1983) Bi methodology and surgical techniques. En: *The Mouse in Biomedical Research*. New York, Ed. Academic Press, v.3, p.419–420.
- 22) Danilovich, N.; Ram Sairam, M. (2006) Recent female mouse models displaying advanced reproductive aging. *Exp Gerontol*; 41:117-122. Disponible en: <https://www-sciencedirect-com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S0531556505002585?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 23) Dawes, J., Liu, B., Mars, W., Michalopoulos, G., Khillan, J. (2010). Multiple ovarian transplants to rescue a transgenic line of mice. *Lab Anim*; 39:191–193. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/lab0610-191>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 24) Deanesly, R. (1957) Egg survival in immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *Biol Sci*; 147:412-421. Disponible en: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspb.1957.0060>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 25) Dobrinsky, J. (1996) Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*; 45:17-26. Disponible en: <https://www-sciencedirect-com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/0093691X95003518?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 26) Doke, S.; Dhawale, S. (2015) Alternatives to animal testing: A review. *SPJ*; 23:223–229. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016413001096>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 27) Donnez, J.; Silber, S.; Andersen, C.; Demeestere, I.; Piver, P.; Meirow, D.; Pellicer, A.; Dolmans, M. (2011) Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births. *Ann Med*; 43:437-450. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/49747396\\_Children\\_born\\_after\\_autotransplantation\\_of\\_cryopreserved\\_ovarian\\_tissue\\_A\\_review\\_of\\_13\\_live\\_births](https://www.researchgate.net/publication/49747396_Children_born_after_autotransplantation_of_cryopreserved_ovarian_tissue_A_review_of_13_live_births). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 28) Dulioust, E.; Toyama, K.; Busnel, M.; Moutier, R.; Carlier, M.; Marchaland, C.; Ducot, B.; Roubertoux, P. (1995) Long-term effects of embryo freezing in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92:589–593. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC42787/>. Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 29) Dyce, K.; Sack, W.; Wensing, C. (2002) Textbook of Veterinary Anatomy. 3a ed. New York, Ed. Saunders, 864 p.
- 30) Eimani, H.; Siadat, S.; Yazdi, P.; Parivar, K.; Valojerdi, M.; Shahverdi, A. (2008) Comparative study between intact and non-intact intramuscular auto-grafted mouse ovaries. *Reprod Biomed Online*; 18: 53-60. Disponible en: [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)60424-5/pdf](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)60424-5/pdf). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 31) Elliot, K.; Whelan, J. (1977) The freezing of mammalian embryos. Amsterdam, Ed. Elsevier, 192 p.
- 32) Eppig, J. (1997) Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev Biol*; 60:371-388.
- 33) Ezoe, K.; Yabuuchi, A.; Tani, T.; Mori, C.; Miki, T.; Takayama, Y.; Beyhan, Z.; Kato, Y.; Okuno, T.; Kobayashi, T.; Kato, K. (2015) Developmental Competence of Vitrified-Warmed Bovine Oocytes at the Germinal-Vesicle Stage is Improved by Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators during In Vitro Maturation. *PLOS ONE*; 10(5): e0126801. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4429023/>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 34) Faddy, M.; Gosden, R.; Edwards, R. (1983) Ovarian follicle dynamics in mice: a comparative study of three inbred strains and an F1 hybrid. *J Endocrinol*; 96:23-33.
- 35) Fahy, G.; MacFarlane, D.; Angell, C.; Meryman, H. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*; 21:407-26.
- 36) Fahy, G. (1986) The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*; 23: 1-13. Disponible en: <http://www.21cmpublications.com/PubFiles/12/2010Fahytoxneutral.pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 37) Faddy, M.; Gosden, R.; Gougeon, A.; Richardson, S.; Nelson, J. (1992) Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*; 7:1342-1346. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Alain\\_Gougeon/publication/21863261\\_Accelerated\\_disappearance\\_of\\_ovarian\\_follicles\\_in\\_mid-life\\_Implications\\_for\\_forecasting\\_menopause/links/5c6d8ef14585156b570d2e18/Accelerated-disappearance-of-ovarian-follicles-in-mid-life-Implications-for-forecasting-menopause.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alain_Gougeon/publication/21863261_Accelerated_disappearance_of_ovarian_follicles_in_mid-life_Implications_for_forecasting_menopause/links/5c6d8ef14585156b570d2e18/Accelerated-disappearance-of-ovarian-follicles-in-mid-life-Implications-for-forecasting-menopause.pdf). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 38) Fox, J.; Barthold, S.; Davisson, M.; Newcomer, C.; Quimby, F.; Smith, A. (2006) The mouse in biomedical research. 2a. ed. Massachusetts, Ed. American Collage of Laboratoy Animal Medicine Science, 791 p.
- 39) Galli, C, Lazzari G. (2008) The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod Domest Anim*; 2: 1-7. Disponible en:



<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.2008.01136.x>. Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 40) Glenister, P.; Thornton, C. (2000) Cryoconservation archiving for the future. *Mamm Genome*; 11: 565-571. Disponible en: <https://link-springer-com.proxy.timbo.org.uy/content/pdf/10.1007%2Fs003350010108.pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 41) Gordon, J.; Ruddle, F. (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*; 214:1244-1246. Disponible en: <https://science.sciencemag.org/content/214/4526/1244.long>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 42) Gosden R. (2008) Ovary and uterus transplantation. *Reproduction*;136:671-680. Disponible en: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/136/6/671.xml>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 43) Gosden, R.; Baird, D.; Wade, J.; Webb, R. (1994) Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum Reprod*; 9: 597–603.
- 44) Green, S.; Audrey, Smith, A.; Zuckerman, S. (1956) The numbers of oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing. *J Endocrinol*; 13: 330-334.
- 45) Gunasena, K.; Lakey, J.; Villines, P.; Bush, M.; Raath, C.; Critser, E.; McGann, L.; Critser, J. (1998) Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*; 53:265-275. Disponible en: <https://www-sciencedirect-com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S0378432098001328?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 46) Gunasena, K.; Lakey, J.; Villines, P.; Critser, E.; Critser, J. (1997) Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol Reprod*; 57:226-231. Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/57/2/226/2760829>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 47) Guo, Q.; Fu, W.; Sopher, B.; Miller, M.; Ware, C.; Martin, G.; Mattson, M. (1999) Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med*; 5:101–106. Disponible en: <http://eds.a.ebscohost.com.proxy.timbo.org.uy:2048/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=a370de47-24f8-4f41-9bda-50cf10004596%40sdc-v-sessmgr02>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 48) Hani, T.; Tachibe, T.; Shingai, S.; Kamada, N.; Ueda, O.; Jishage, K. (2006) Fertility of mice receiving vitrified adult mouse ovaries. *Reproduction*; 131:681–687.

Disponible en: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/131/4/1310681.xml>.  
Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 49) Harp, H.; Leibach, J.; Black, J.; Keldahl, C.; Karow, A. (1994) Cryopreservation of Murine Ovarian Tissue. *Cryobiology*; 31:336-343.
- 50) Hasegawa, A.; Mochida, N.; Ogasawara, T.; Koyama, K. (2006) Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. *Fertil Steril*; 4:1182-1192. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(06\)01086-7/abstract](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(06)01086-7/abstract). Fecha de entrega: 18/10/2019.
- 51) Hernández, S. (2006) El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *BIOMEDICINA*; 2: 252-256. <https://www.sciencedirect-com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S0011224015000620?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 52) Huang, K.; Groot, S.; Woelders, H.; Van der Horst, G.; Themmen, A.; Colenbrander, B.; Fentener van Vlissingen, M. (2009) Functionality of cryopreserved juvenile ovaries from mutant mice in different genetic background strains after allotransplantation. *Cryobiology*; 60(2):129-137. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 53) Huang, K.; Groot, S.; Woelders, H.; Horst, G.; Themmen, A.; Colenbrander, B.; Vlissingen, M. (2010) Functionality of cryopreserved juvenile ovaries from mutant mice in different genetic background strains after allotransplantation. *Cryobiology*; 60:129-137. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S0011224009001412?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 54) Isachenko, V.; Isachenko, E.; Ostashko, F.; Grishchenko, V. (1997) Ultra-rapid freezing of rat embryos with rapid dilution of permeable cryoprotectants. *Cryobiology*; 34:157-164.
- 55) Isachenko, V.; Isachenko, E.; Ostashko, F.; Grishchenko, V. (1997) Ultrarapid Freezing of Rat Embryos with Rapid Dilution of Permeable Cryoprotectants. *Cryobiology*; 34: 157-164. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S001122409691994X?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 56) Israely, T.; Dafni, H.; Nevo, N.; Tsafirri, A.; Neeman, M. (2004) Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Med*; 52:741-750. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrm.20203>. Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 57) Jang, T.; Park, S.; Yang, J.; Kim, J.; Seok, J.; Park, U.; Choi, C.; Lee, S.; Hanb, J. (2017) Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res*; 6: 12–18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395684/>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 58) Jimenez-Trigos, E.; Vicente, J.; Marco-Jimenez, F. (2014) First pregnancy and live birth from vitrified rabbit oocytes after intraoviductal transfer and in vivo fertilization. *Theriogenology*; 82: 599–604. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S0093691X14002751?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 59) Johnson, J.; Canning, j; Kaneko, T.; Pru, J.; Tilly, J. (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*; 428:145-150. Disponible en: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-2-24>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 60) Jones, E.; Krohn, P. (1960) Orthotopic ovarian transplantation in mice. *J Endocrinol*; 20:135-146.
- 61) Karlsson, J.; Toner, M. (1996) Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*; 17:243-56. Disponible en: <https://kundoc.com/pdf-long-term-storage-of-tissues-by-cryopreservation-critical-issues-.html>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 62) Kashuba, B.; Benson J.; Critser, J. (2008) An improved cryopreservation method for a mouse embryonic stem cel line. *Cryobiology*; 56: 120-130. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2374758/>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 63) Knight, J.; Abbott, A. (2002) Mouse genetics: Full house. *Nature*; 417: 785-786. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/417785a>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 64) Kubota, C.; Yang, X.; Dinnyés, A.; Todoroki, J.; Yamakuchi, H.; Mizoshita, K.; Inohae, S.; Tabara, N. (1998) In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer and parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev*; 51:281–286. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291098-2795%28199811%2951%3A3%3C281%3A%3AAID-MRD7%3E3.0.CO%3B2-L>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 65) Landel, C. (2005) Archiving mouse strains by cryopreservation. *Lab Anim*; 34: 50-57.
- 66) Leibo, S. (1980) Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. *J Membran Biol*; 53: 179-188.
- 67) Li, Q.; Szatmary, P.; Liu, Y.; Ding, Z.; Zhou, J.; Sun, Y.; Luo, F.; Wang, Y.; Zhu, J. (2015) Orthotopic Transplantation of Cryopreserved Mouse Ovaries and Gonadotrophin Releasing Hormone Analogues in the Restoration of Function following

Chemotherapy-Induced Ovarian Damage. PLOS ONE; 26:10(3). Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0120736>. Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 68) Liu, J.; Van der Elst, J.; Van den Broecke, R.; Dhont, M. (2001) Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol Reprod*; 64:171-178.
- 69) Liu, J.; Elst, J.V.; Broecke, R.V.; Dhont, M. (2002) Early Massive Follicle Loss and Apoptosis in Heterotopically Grafted Newborn Mouse Ovaries. *Hum Reprod*; 17: 605-611.
- 70) Martino, A.; Songansen, N.; Leibo, S. (1996) Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling of very small samples. *Biol Reprod*; 54:1059–1069. Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/54/5/1059/2761940>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 71) Mazur, P.; Leibo, S.; Chu, E. (1972) A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*; 71:345-355.
- 72) Mazur, P. (1977) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*; 14:251-272. Disponible en: <https://www.osti.gov/servlets/purl/7336219>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 73) Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*; 247:125-142. Disponible en: <https://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 74) Mazur, P.; Schneider, U. (1986) Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys*; 8: 259.
- 75) Mazur, P. (1990) Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys*; 17: 53-92.
- 76) Mazur, P.; Leibo, S.; Seidel, G. (2008) Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod*; 78:2-12. Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/78/1/2/2629758>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 77) McGee, E.; Hsueh, A. (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*; 21:200-214. Disponible en: <https://academic.oup.com/edrv/article/21/2/200/2423956>. Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 78)McLean, A.; Valenzuela, N.; Fai, S.; Bennett, S. (2012) Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *J Vis Exp*; 67:4389. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3490233/>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 79)Migishima, F.; Suzuki, R.; Song, S.; Kuramochi, T.; Azuma, S.; Nishijima, M.; Yokoyama, M. (2003) Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod*; 68(3):881-887. Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/68/3/881/2683559>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 80)Migishima,F.; Suzuki, R.; Quintero, R.; Yokoyama, M.; Behr, B. (2006) Successful pregnancies after transplantation of frozen-thawed mouse ovaries into chimeric mice that received lethal-dose radiation. *Fertil Steril*; 86:1080-1087. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(06\)01092-2/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(06)01092-2/fulltext). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 81)Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018) El número de animales de investigación se redujo un 43% entre 2009 y 2017. Disponible en: <https://www.diariomedico.com/investigacion/el-numero-de-animales-de-investigacion-se-redujo-un-43-entre-2009-y-2017.html>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 82)Montoliu L. (2019) Editando genes: recorta, pega y colorea. Pamplona, Ed. Next Door, 434 p.
- 83)Myers, M.; Britt, K.; Wreford, N.; Ebling, F.; Kerr, J. (2004) Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*; 127:569-580. Disponible en: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/127/5/1270569.xml>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 84)Nakagata, N. (2002) Transgenesis Techniques. Principles and Protocols. 2a. ed. New Jersey, Ed. Humana Press, 351 p.
- 85)Nakagata, N. (2015) Técnicas de ingeniería reproductiva del ratón. 3a. ed. Tokio, Ed. Cosmo Bios, 90 p.
- 86)National Research Council. (2017) Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. 8va. ed. Santiago de Chile, Ed. Universidad Católica de Chile, 258 p.
- 87)Nomura, T. (1987) Defined laboratory animals. *Adv Pharmacol Therap*; 5: 325-333.
- 88) Nuffield Council on Bioethics (2005). The ethics of research involving animals. Londres, Ed. Nuffield Council on Bioethics, 376 pp. Disponible en: <https://www.nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/The-ethics-of-research-involving-animals-full-report.pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 89) Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J.; Murphy, M.; Golde, T.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M.; Akbari, Y.; LaFerla, F. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*; 39:409-421. Disponible en: [https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(03\)00434-3?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627303004343%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(03)00434-3?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627303004343%3Fshowall%3Dtrue). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 90) Oktay, K.; Karlikaya, G.; Aydin, B. (2000) Ovarian cryopreservation and transplantation: basic aspects. *Mol. Cell. Endocrinol*; 169:105-108. Disponible en: <http://www.bulentaltaydin.info/dosyalar/files/pdf8.pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 91) Parrot, D. (1960) The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil*; 1:230-241. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.581.3573&rep=rep1&type=pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 92) Partridge, A.; Gelber, S.; Peppercorn, J.; Sampson, E.; Knudsen, K.; Laufer, M.; Rosenberg, R.; Przepyszny, M.; Rein, A.; Winer, E. (2004) Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. *J. Clin Oncol*; 22: 4174-4183. Disponible en: [https://ascopubs.org/doi/full/10.1200/JCO.2004.01.159?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr pub%3Dpubmed](https://ascopubs.org/doi/full/10.1200/JCO.2004.01.159?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr pub%3Dpubmed). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 93) Perret, M. (2015) Tips for Successfully Breeding Your Mice. Disponible en: [http://research.utsa.edu/wp-content/uploads/2015/02/tips\\_for\\_successfully\\_breeding\\_your\\_mice.pdf](http://research.utsa.edu/wp-content/uploads/2015/02/tips_for_successfully_breeding_your_mice.pdf). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 94) Pomeroy, K. (1991) Cryopreservation of transgenic mice. *Genet Anal Tech Appl*; 8:95-101.
- 95) Portillo, L.; Madero, J.; López, C.; León, M.; Acosta, L.; Gómez, C.; Delgado, L.; Gómez, C.; Lozano, J.; Reguero, M. (2006) Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol*; 57: 291-300. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0034-74342006000400008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-74342006000400008). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 96) Rall, W.; Fahy, G. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees by vitrification. *Nature*; 313:573-575.
- 97) Ranganatha, N.; Kuppast, J. (2012) A review on alternatives to animal testing methods in drug development. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*; 4: 28-32. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/8440/666fb4012bcddb6f23b86a1c9a28db214e6f.pdf> Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 98) Robertson, G. (1940) Ovarian transplantation in the house mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*; 44: 302–304.
- 99) Rogawski, M.; Wenk, G. (2003) The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev*; 9:275-308. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1527-3458.2003.tb00254.x>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 100) Russell, W.; Burch, R. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. Londres, Ed. Universities Federation for Animal Welfare, 238 p.
- 101) Russell, W.; Hurst, J. (1945) Pure strain mice born to hybrid mothers following ovarian transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 31: 267–273. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/f1d7/900bee1ce89ad58112bae42d3281c5e7ffe.pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 102) Salenhia, M. (2002) Autograft of Vitrified Mouse Ovaries Using Ethylene Glycol as Cryoprotectant. *Exp Animal*; 51:509-512. Disponible en: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/51/5/51\\_5\\_509/article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/51/5/51_5_509/article/-char/ja/). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 103) Schmidt, K.; Ernst, E.; Byskov, A.; Andersen, N.; Yding, C.; Andersen, C. (2003) Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum Reprod*; 2654:2659. Disponible en: <https://academic.oup.com/humrep/article/18/12/2654/2913497>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 104) Selkoe, D. (2001) Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*; 81:741–766. Disponible en: <https://www.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.2001.81.2.741>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 105) Shanshan, G.; Mei, L.; Keliang, W.; Yan, S.; Rong, T.; Zi-Jiang, C. (2015) Effect of different rehydration temperatures on the survival of human vitrified-warmed oocytes. *J Assis Reprod Gen*; 10:1197-1203. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4554382/>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 106) Shaw, J.; Cox, S.; Trounson, A.; Jenkin, G. (2000) Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Mol Cell Endocrinol*; 161:103–110. Disponible en: [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/39809697/Shaw\\_JM\\_Cox\\_SL\\_Trounson\\_AO\\_Jenkin\\_GEvalu20151108-25936-1kdsg2l.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DEvaluation\\_of\\_the\\_long-term\\_function\\_of.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20191021%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4\\_request&X-Amz-Date=20191021T000000Z&X-Amz-](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/39809697/Shaw_JM_Cox_SL_Trounson_AO_Jenkin_GEvalu20151108-25936-1kdsg2l.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DEvaluation_of_the_long-term_function_of.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20191021%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20191021T000000Z&X-Amz-)

Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=85fec02e346900587ada2ed90ee3a2a328af2cd35d285675ed80fe4c5a3daeb7. Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 107) Shaw, J.; Oranratnachai, A.; Trounson, A. (2000) Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*; 53:59-72. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S0093691X9900240X?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 108) Shaw, J.; Trounson, A. (2002) Ovarian Tissue Transplantation and Cryopreservation. *Methods Mol Biol*; 180: 229-252. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Alan\\_Trounson/publication/11488277\\_Ovarian\\_tissue\\_transplantation\\_and\\_cryopreservation\\_Application\\_to\\_maintenance\\_and\\_recovery\\_of\\_transgenic\\_and\\_inbred\\_mouse\\_lines/links/0f317531b69b8ccc51000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alan_Trounson/publication/11488277_Ovarian_tissue_transplantation_and_cryopreservation_Application_to_maintenance_and_recovery_of_transgenic_and_inbred_mouse_lines/links/0f317531b69b8ccc51000000.pdf). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 109) Silber, S.; DeRosa, M.; Goldsmith, S.; Fan, Y.; Castleman, L.; Melnick, J. (2018) Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA. *J Assis Reprod Genet*; 35:2205–2213. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6289920/>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 110) Silver, L. (1995) *Mouse Genetics: Concepts and applications*. Bar Harbor, Ed. Oxford University Press, 362 p.
- 111) Soleimani, R.; Heytens, E.; Van den Broecke, R.; Rottiers, I.; Dhont, M.; Cuvelier, C.A. (2010) Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue into murine back muscle.
- 112) Stachecki, J.; Cohen, J.; Willadsen, S. (1998) Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. *Biol Reprod*; 59:395-400. Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/59/2/395/2740950>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 113) Stevens, L. (1957) A modification of Robertson's technique of homoiotopic ovarian transplantation in mice. *Transplant Bull*; 4: 106–107.
- 114) Sugimoto, M; Maeda, S; Manabe, N; Miyamoto, H. (2000) Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology*; 53:1093-1103. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S0093691X00002557?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 115) Sztejn, J.; Farley, J.; Mobraaten, L. (2000) In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol Reprod*; 63: 1774-1780. Disponible en:



<https://academic.oup.com/biolreprod/article/63/6/1774/2723459>. Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 116) Sztein, J.; Sweet, H.; Farley, J.; Mobraaten, L. (1998) Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: a new approach in gamete banking. *Biol Reprod*; 58:1071–1074. Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/58/4/1071/2761234>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 117) Sztein, J.; McGregor, T.; Hendirck, J.; Mobraaten, L. (1999) Transgenic mouse strain rescue by frozen ovaries. *Lab Anim Sci*; 49: 99-100. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/1999/00000049/00000001/art00017>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 118) Takahashi, E.; Miyoshi, I.; Nagasu, T. (2001) Rescue of a Transgenic Mouse Line by Transplantation of a Frozen-Thawed Ovary Obtained post mortem. *Contemp. Tbp. Lab. Anima Sci.* 40 (4) :28-31. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2001/00000040/00000004/art00005?crawler=true>. 18/10/2019.
- 119) Takahashi, K.; Mukaida, T.; Goto, T.; Oka, C. (2005) Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: A 4-year follow-up study. *Fertil Steril*; 84: 88-92. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(05\)00563-7/pdf](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(05)00563-7/pdf). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 120) The Jackson Laboratory. (2003) Mouse Phenome Database Web Site. Disponible en: [www.jax.org/phenome](http://www.jax.org/phenome). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 121) The Jackson Laboratory (2007) Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice: A Jackson Laboratory Resource Manual. Disponible en: [http://ko.cwru.edu/info/breeding\\_strategies\\_manual.pdf](http://ko.cwru.edu/info/breeding_strategies_manual.pdf). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 122) The Jackson Laboratory. (2018) Reproductive Biology in mice, Technical information service. Disponible en: [http://jackson.jax.org/rs/444-BUH-304/images/Reproductive\\_Biology\\_of\\_Mice\\_Wbnr\\_3Aug2017.pdf](http://jackson.jax.org/rs/444-BUH-304/images/Reproductive_Biology_of_Mice_Wbnr_3Aug2017.pdf). Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 123) Thornton, C.; Brown, S.; Glenister, P.; (1999) Large number of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: implication and application for genetic resource banks, mutagenesis screens, and mouse backcrossed. *Mamm Genome*; 10: 987-992.
- 124) Unión Europea (2010) Informe sobre las estadísticas relativas a los animales para experimentación animal u otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea. Disponible en <https://eur->

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2010:0511:FIN:Es:PDF](http://lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2010:0511:FIN:Es:PDF). Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 125) Wang, Y.; Xiao, Z.; Li, L.; Fan, W.; Li, S. (2008) Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreserve. *Hum Reprod*; 23: 2256–2265. Disponible en: <https://academic.oup.com/humrep/article/23/10/2256/712804>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 126) Whittingham, D.; Leibo, S.; Mazur, P. (1972) Survival of Mouse embryos frozen to -196 °C and -269 °C. *Science*; 178:411-414.
- 127) Whittingham, D.; Lyon, M.; Glenister, P. (1977) Re-establishment of breeding stocks of mutant and inbred strains of mice from embryos stored at -196°C for prolonged periods. *Genet Res*; 30:287–299. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/genetics-research/article/reestablishment-of-breeding-stocks-of-mutant-and-inbred-strains-of-mice-from-embryos-stored-at-196-c-for-prolonged-periods/60FDACD005349381E4BFB7FF8EEC9C0A>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 128) Wise, P.; Smith, M.; Dubal, D.; Wilson, M.; Krajnak, K.; Rosewell, K. (1999) Neuroendocrine influences and repercussions of the menopause. *Endocr Rev*; 20:243-248. Disponible en: <https://academic.oup.com/edrv/article/20/3/243/2530813>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 129) Wise, P.; Smith, M.; Dubal, D.; Wilson, M.; Rau, S.; Cashion, A.; Böttner, M.; Rosewell, K. (2002) Neuroendocrine modulation and repercussions of female reproductive aging. *Recent Prog Horm Res*; 57:235-256. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/292f/af895bed40c3608c98a746e342e2017e4993.pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 130) Woods, E.; Benson, J.; Agca, Y.; Critser, J. (2004) Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*; 48: 146-56. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com.proxy.timbo.org.uy/science/article/pii/S0011224004000288?via%3Dihub>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 131) Wu, J.; Zelinski, M.; Ingram, D.; Ottinger, M. (2005) Ovarian aging and menopause: current theories, hypotheses, and research models. *Exp Biol Med*; 230:818-828.
- 132) Xu, M.; Banc, A.; Woodruff, TK.; Shea, LD. (2009) Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles. *Biotechnol Bioeng*; 103(2):378-386.
- 133) Yeoman, R.; Wolf, D.; David, M.; Lee, D. (2005) Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertil Steril*; 83: 1248-1254.

Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(04\)03244-3/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(04)03244-3/fulltext). Fecha de consulta: 18/10/2019.

- 134) Youm, H.; Lee, J.; Lee, J.; Jee, Y.; Suh, C.; Kim, S. (2014) Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified–warmed ovarian tissue survival. *Hum Reprod*; 29: 720–730. Disponible en: <https://academic.oup.com/humrep/article/29/4/720/603668>. Fecha de consulta: 18/10/2019.
- 135) Zúñiga, J.; Orellana, J. (2016) Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal. 2da. Ed. Alcalá, Universidad de Alcalá. Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), V1, 550 p.