



El proyecto MOTHER: la criopreservación de la corteza ovárica como opción para la conservación de los recursos genéticos

PAULA ROMERO MUÑOZ. Área de Genética y Reproducción Animal. paularm@serida.org

CARMEN DÍEZ MONFORTE. Área de Genética y Reproducción Animal. mcdiez@serida.org

SUSANA CARROCERA COSTA. Área de Genética y Reproducción Animal. scarrocera@serida.org

MARÍA AURORA GARCÍA MARTÍNEZ. Área de Genética y Reproducción Animal. mauroragm@serida.org

MARTA MUÑOZ LLAMOSAS. Área de Genética y Reproducción Animal. mmunoz@serida.org

La criopreservación (conservación a baja temperatura; CP) de semen y embriones es una técnica que se emplea rutinariamente en especies domésticas de interés económico, así como en especies silvestres en peligro de extinción (en el caso del semen). El interés de la CP es doble. Por una parte, el uso del semen y embriones criopreservados es esencial en los programas de mejora genética de la cabaña ganadera para impulsar la eficiencia de la producción animal y con ello incrementar la rentabilidad de las explotaciones. Por otro lado, en el caso de los programas de conservación de razas y especies en riesgo de desaparición, el almacenamiento de semen y embriones criopreservados en los bancos de recursos zoogenéticos (BRZ) permite mantener la variabilidad genética indefinidamente, lo que permite garantizar su supervivencia.

De igual forma que sucede con espermatozoides y embriones, una CP eficaz de los ovocitos permitiría una gestión más eficiente del ganado y de las especies de animales silvestres y de laboratorio. En el caso de los programas de mejora genética, los ovocitos criopreservados podrían almacenarse hasta que la hembra expresara su mérito genético y se pu-

diera realizar el apareamiento adecuado, pero también podrían ser incorporados a los BRZ, manteniendo intacta la fertilidad de la hembra. También se facilitaría su uso en procedimientos de reproducción asistida con ovocitos recuperados de hembras que mueren accidentalmente o que deben ser sacrificadas por motivos sanitarios (Araújo et al., 2014).

Sin embargo, a pesar de estos potenciales beneficios, la especial sensibilidad a las bajas temperaturas de los ovocitos hace que hoy en día no se disponga de protocolos eficientes que permitan su aplicación de forma rutinaria.

En este sentido, las tasas de desarrollo de los ovocitos criopreservados son significativamente inferiores a las mostradas por los ovocitos frescos (Díez et al., 2012); este hecho se observa no sólo en el caso del ganado bovino, sino también en mu-



↓
Figura 1..-Procesado de ovarios, disección de corteza ovárica y criopreservación.

chas otras especies domésticas y silvestres, al igual que en la especie humana.

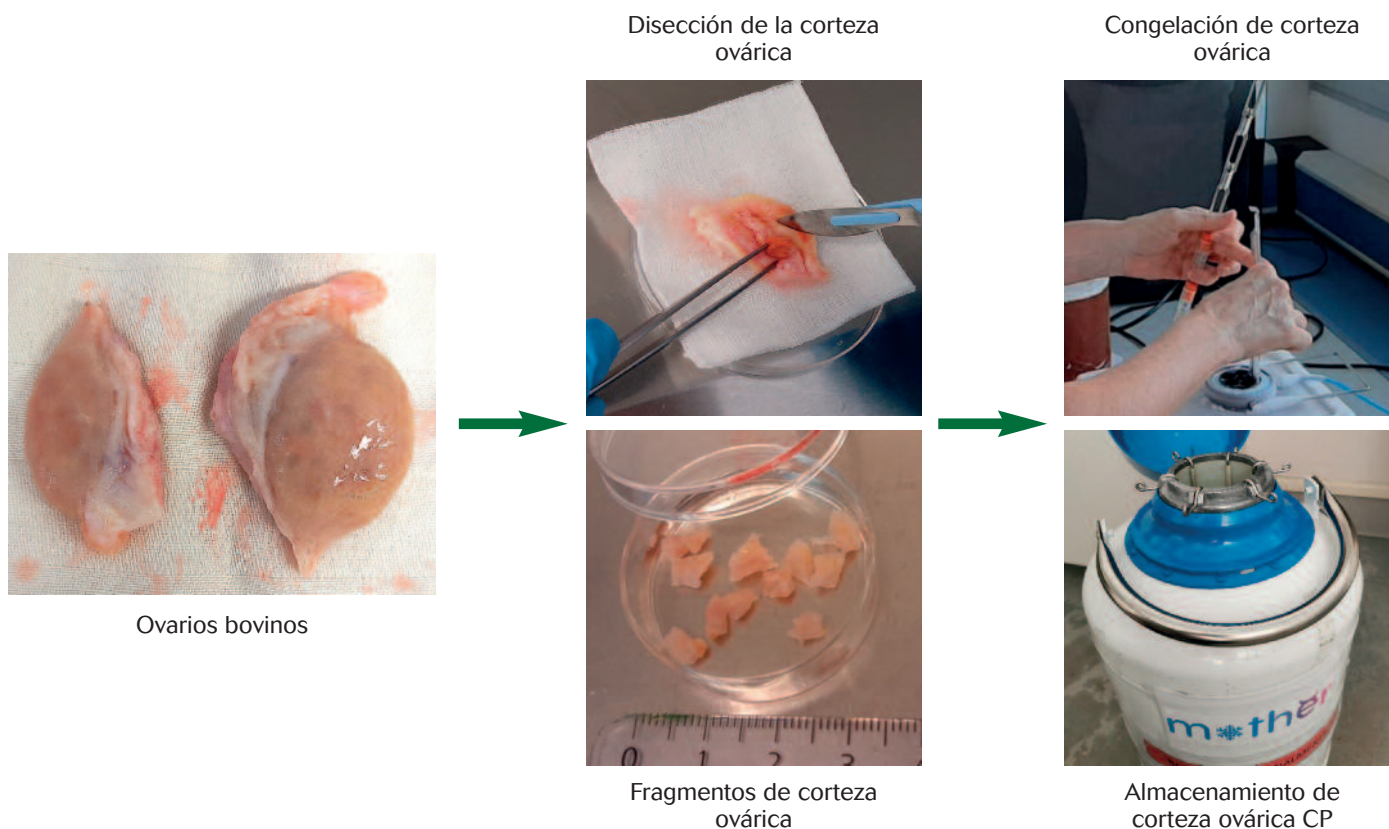
Los daños que sufren los ovocitos como consecuencia de los procesos de CP son considerables y su alcance depende de factores relacionados con la especie, la etapa de desarrollo y la capacidad del ovocito para reparar total o parcialmente el daño y continuar con el desarrollo normal (Fuller & Paynter, 2004). Las razones de esta especial sensibilidad son múltiples, y responden a las especiales características morfológicas y funcionales de los gametos femeninos.

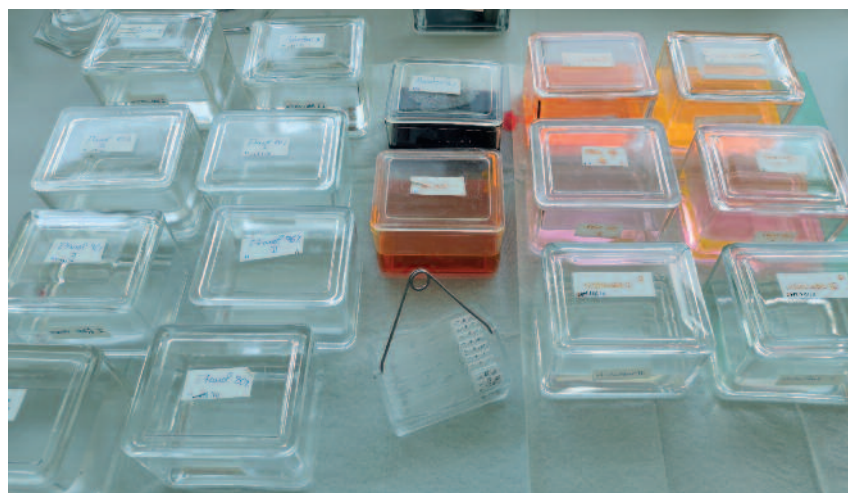
Como alternativa a la CP de ovocitos, durante los últimos 15 años se han desarrollado protocolos de CP de la corteza ovárica (CO), parte externa del ovario que contiene la reserva de ovocitos de la que la hembra va a hacer uso durante su vida reproductiva. En la CO, los ovocitos se encuentran en unas estructuras denominadas folículos que, según su grado de desarrollo, se clasifican en: primordiales, preantrales (primarios y secundarios), antrales y ovulatorios. Durante la vida reproductiva de la hembra, solo una

ínfima cantidad de estos folículos va a llegar a crecer y liberar un ovocito apto para ser fecundado; de esta forma, la gran mayoría de los folículos está destinada a sufrir un proceso degenerativo llamado atresia que conllevará la pérdida del ovocito que contenía. Este reducido número de ovocitos potencialmente disponibles para su uso en reproducción en condiciones naturales, supone un desperdicio indeseable de recursos genéticos (Campos et al., 2019).

Consecuentemente, la corteza ovárica es una fuente inestimable de gametos femeninos, y su CP permitiría mejorar los programas de cría animal, preservar especies animales amenazadas o hembras de alto mérito genético, aprovechando al máximo el potencial reproductivo femenino individual (Fig. 1).

En este contexto, el proyecto MOTHER tiene como objetivo general investigar las condiciones óptimas de CP de la corteza ovárica de ganado bovino para salvaguardar las diferentes poblaciones de folículos y ovocitos presentes en el ovario, como alternativa a la CP de ovocitos.





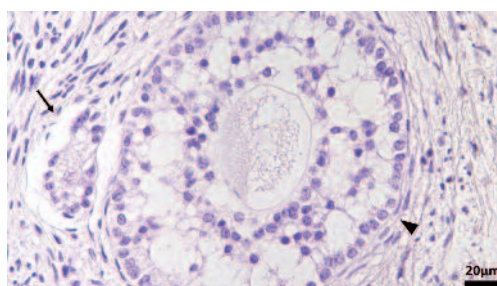
Para lograr este objetivo, MOTHER plantea varias aproximaciones que se abordarán en diferentes paquetes de trabajo:

- Comparar el efecto de dos protocolos de CP (congelación y vitrificación) de folículos antrales sobre la supervivencia de los ovocitos que contienen.
- Evaluar y comparar el efecto de los protocolos de CP (congelación y vitrificación) de corteza ovárica sobre la morfología y estructura de las diferentes poblaciones foliculares preantrales (folículos primordiales, primarios y secundarios) (Figs. 1, 2 y 3).
- Optimizar el aislamiento de folículos preantrales obtenidos a partir de CO fresca y sometida a CP.
- Establecer un sistema eficiente de cultivo *in vitro* de los folículos preantrales obtenidos y recuperación de los ovocitos en un estadio de desarrollo compatible con su utilización para producir embriones *in vitro*.
- Evaluar la viabilidad *in vivo* de los embriones producidos a partir de ovocitos obtenidos de folículos de corteza criopreservada.

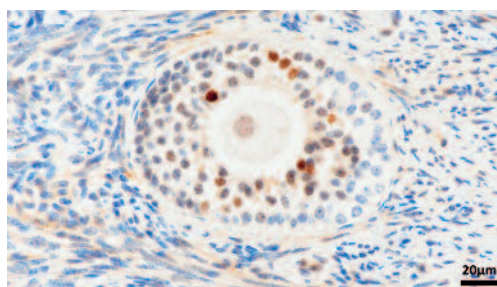
El proyecto ha iniciado ya su andadura y, en su fase inicial, los experimentos realizados están evaluando los efectos del uso de un protocolo de congelación y



Evaluación microscópica



Trinción con hematoxilina y eosina: Folículo secundario (cabeza de flecha); Folículo desprendido de la membrana basal (flecha)



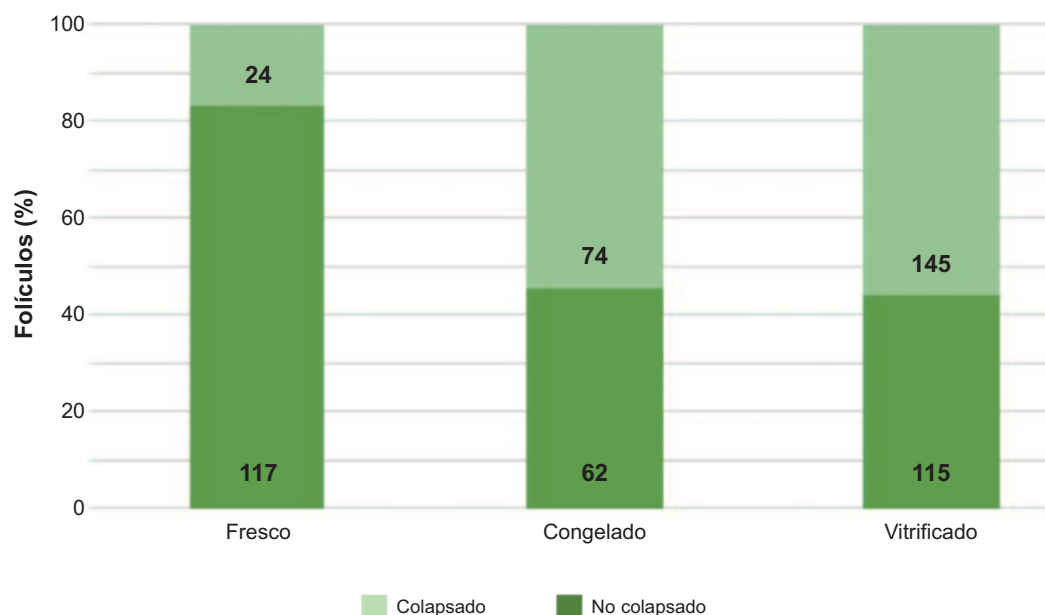
Trinción inmunohistoquímica de Ki67: los núcleos positivos (marrón) son indicadores de actividad proliferativa

↑
Figura 2.—Procesado de muestras de corteza ovárica para análisis histológico y de inmunohistoquímica.

←
Figura 3.—Análisis microscópico de muestras de corteza ovárica.



Figura 4.-Porcentajes de folículos No Colapsados (morfológicamente normales) y Colapsados en corteza ovárica fresca, congelada y vitrificada. Los números indican el total de folículos valorados.



otro de vitrificación sobre la morfología de los folículos preantrales, así como sobre la capacidad de proliferación de las células de la granulosa, que recubren internamente los folículos. Los resultados preliminares, permiten avanzar que la CP afecta significativamente a la integridad de la CO, al producir una disminución del porcentaje de folículos morfológicamente normales (Fig. 4) (Romero et al., 2024. 17º Congreso AERA; en prensa).

MOTHER está liderado desde el Área de Genética y Reproducción Animal del SERIDA. Para desarrollo del proyecto, de 4 años de duración, se ha constituido un consorcio investigador multidisciplinar en el que, además del SERIDA y la Universidad de Oviedo, participan el Instituto Nacional para la Investigación Agronómica de Francia (INRAe), la Academia Polaca de Ciencias, la Universidad de Ciencias de la Vida de Estonia y compañías biotecnológicas como la clínica de reproducción asistida ERGO (España) o CONCEPTEASY (Estonia).

Proyecto MOTHER: PID2022-138633 OR-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER UE. Contrato de Paula Romero Muñoz: PREP20

22-000436 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FSE+.

Bibliografía

- ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. & GASTAL, E. L. (2014). In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 12, 78. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-78>.
- CAMPOS, L. B.; PRAXEDES, É. C. G.; SARAIVA, M. V. A.; COMIZZOLI, P. & SILVA, A. R. (2019). Advances and Challenges of Using Ovarian Preantral Follicles to Develop Biobanks of Wild Mammals. *Biopreservation and Biobanking*, 17(4), 334-341. <https://doi.org/10.1089/BIO.2018.0130>.
- DÍEZ, C.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J. N. & GÓMEZ, E. (2012). Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 Suppl 3 (SUPPL.3), 76-83. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2012.02029.X>.
- FULLER, B. & PAYNTER, S. (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive Biomedicine Online*, 9(6), 680-691. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61780-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61780-4).
- ROMERO, P.; DÍEZ, C.; CARROCERA, S.; GARCÍA, MA.; IGLESIAS, T. & MUÑOZ, M. (2024). 17º Congreso AERA; en prensa. ■

