

TESIS DOCTORAL

COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD FOLICULAR TRAS LA APLICACIÓN DE 3 MÉTODOS DE SEPARACIÓN MEDULAR PREVIO A CRIOPRESERVACIÓN OVÁRICA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Susana Monzó Fabuel

Licenciada en medicina

Dirigida por:

Dra. Sonia Herraiz Raya

Dr. César Díaz García

Programa de doctorado 3139 Medicina. Departamento de Pediatría, Obstetricia y
Ginecología

Enero de 2020

*Es necesario soportar dos o tres
orugas si quieres conocer las mariposas*

Antoine De Saint-Exupéry

A Quina y a Joaquina

Y a Paco por darme a una de ellas

AGRADECIMIENTOS

Sonia, gracias por enseñarme la ciencia básica. No siempre se tiene la oportunidad de adentrarse en este mundo de la mano de una persona tan inteligente disciplinada y cercana. Gracias por tu paciencia.

César, gracias por confiar en mi para este proyecto. Gracias a ti me adentré en el mundo de la reproducción. Siempre te estaré agradecida.

A Pepe Bellver por su disponibilidad y su amabilidad.

A todo el equipo de reproducción por estar ahí día tras día y a todo el personal de investigación que ha colaborado en el proyecto. Por supuesto a todas las pacientes que de manera altruista participaron en el estudio. Ellas son parte imprescindible para que la ciencia evolucione.

A mis compañeros y a mi guardia, todo empezó cuando éramos residentes, y cuánto hemos cambiado.

A mis amigas de la facultad, pasarse tantas horas entre 4 paredes une mucho. Ahora seguimos incluso más unidas y ampliando la familia. Gracias, chicas por todos los momentos a vuestro lado.

A mis princesas. Todo empezó en los pasillos de un instituto. 20 años después seguimos juntas celebrando la vida.

A todas las personas con las que he compartido grandes momentos. Los recuerdos nos pertenecen.

A mi familia, parte imprescindible de mi vida. A los que ya no están, pero sé que estarían muy orgullosos. Y a los que sí que están decirles que os quiero.

A Paco, mi marido y mi gran apoyo. Sé que tienes casi tantas ganas como yo de ver este trabajo culminado. Gracias por ser un ejemplo de constancia y tenacidad. Gracias por quererme, y ayudarme.

A Quina, por hacerme entender lo que es el amor incondicional.

A mi madre, ejemplo de bondad y humildad. Nunca podré agradecerte todo lo que haces por mí.

I. Índice abreviaturas.....	13
II. Lista de figuras.....	17
III. Lista de tablas.....	19
1. Introducción.....	21
1. 1. Aparato reproductor femenino.....	21
1.1.1 Anatomía	
1.1.2. Histología	
1.1.3. Embriología	
1.1.4 Desarrollo folicular	
1.2. Enfermedades neoplásicas.....	31
1.2.1. Definición	
1.2.2. Epidemiología	
1.2.2.1. En mujeres jóvenes y adultas	
1.2.2.2. En edad infantil	
1.2.2.3. Supervivencia	
1.3. Efectos secundarios generales de los tratamientos antineoplásicos.....	33
1.3.1. Efectos secundarios a nivel sistémico	
1.3.2. Efectos secundarios a nivel gonadal	
1.3.2.1. Mecanismos	
1.3.2.2. Efectos clínicos	
1.4. Técnicas de preservación de la fertilidad.....	44
1.4.1 Análogos de la GnRh	

1.4.2 Ofooropexia	
1.4.3 Criopreservación de embriones	
1.4.4 Criopreservación de ovocitos	
1.4.5. Criopreservación de corteza	
1.5. Criopreservación de corteza ovárica.....	51
1.5.1 Mecanismos de crioprotección	
1.5.1.1. Congelación lenta	
1.5.1.2. Vitrificación	
1.5.2 Retrasplante	
1.5.3 Mecanismos de separación de corteza-médula	
2.Hipótesis.....	57
3. Objetivos.....	59
3.1 Objetivo principal.....	59
3.2 Objetivos secundarios.....	59
4. Material y métodos.....	61
4.1 Diseño del estudio y técnicas de decorticación.....	61
4.1.1 Muestras de tejido ovárico humano	
4.2 Estudio in vitro.....	65
4.2.1. Incubación de corteza ovárica	
4.2.2 Evaluación histológica y de la densidad folicular.	
4.2.3 Análisis de la viabilidad folicular: TUNEL mediante inmunofluorescencia	
4.2.4 Cuantificación de TNF α en medio de cultivo mediante ELISA	

4.2.5	Expresión génica de HSP 60, genes ruta Hippo y Caspasa 3	
4.2.5.1	Extracción y retrotranscripción de ARN de muestras en fresco	
4.2.5.2	Extracción y retrotranscripción de ARN de muestras en parafina	
4.2.5.3	RTqPCR	
4.3.	Estudio In vivo.....	78
4.3.1	Grupos experimentales	
4.3.2	Técnicas de criopreservación	
4.3.2.1.	Congelación lenta y descongelación	
4.3.2.2.	Vitrificación y desvitrificación.	
4.3.3	Xenotrasplante en ratón Nude	
4.3.4	Valoración histológica y de la densidad folicular	
4.3.5.	Cuantificación del estradiol	
4.3.5.1.	Preparación de la muestra y de los reactivos del ensayo	
4.3.5.2.	Configuración de placa	
4.3.5.3	Realización del ensayo	
4.3.5.4	Análisis	
4.3.6.	Análisis de la vascularización y proliferación celular en el xenotrasplante mediante inmunohistoquímica.	
4.3.6.1.	Análisis de fibrosis mediante tinción con tricrómico de Masson	
4.4	Análisis estadístico.....	90
5.	Resultados.....	91
5.1.	Resultados de estudios experimentales in vitro.....	91
5.1.1	Evaluación histológica y del contaje folicular.	
5.1.2	Evaluación de viabilidad mediante TUNEL	

5.1.3 Cuantificación de Caspasa-3	
5.1.4 Cuantificación TNF	
5.1.5 Cuantificación HSP-60	
5.1.6 Expresión relativa de los genes de la ruta Hippo	
5.2. Resultados de estudios experimentales in vivo.....	98
5.2.1. Evaluación histológica y contaje folicular	
5.2.2. Evaluación de la vascularización y proliferación celular	
5.2.3. Evaluación del estradiol	
6. Discusión.....	105
7. Conclusiones.....	115
8. Bibliografía.....	117
9. Apéndice documental.....	129

I. Índice de abreviaturas

AA: Agentes alquilantes

AChE : Estradiol-aceticolisnesterasa conjugado

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Copia de ácido desoxirribonucleico

AMH: Hormona antimülleriana

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Asp: Ácido aspártico

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

BIRD: *Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing*

BSA: Albúmina de suero bovino

CCN: Acrónimo de *Connective tissue growth factor, Cystein rich protein, and Nephroblastoma overexpressed gene*

CG: Células de la granulosa

CO: Corteza ovárica

Ct: *Cycle Threshold*, Ciclo umbral

DAB: Diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEPC: Dietilpirocarbonato

desoxiNTP: Desoxinucleósido trifosfato

dUTP: 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato

DS: Desviación estándar

DMSO: Dimetil sulfóxido sulfato

E2: Estradiol

EG: Etinoglicol

FAM: Carboxi-fluoresceína

FSH: Hormona folículoestimulante

FFPE: *Formalin Fixed Paraffin-Embedded*

FOP: Fallo ovárico precoz

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

Gy: Grey

HSA: Seroalbúmina humana

HSP: *Heat shock protein*, proteínas de choque térmico

IL: Inteleucina

IQR: Rango intercuartílico

kDa: KiloDalton

LH: Hormona luteinizante

LOD: Límite de detección

LPS: Laparoscopia

MII: Metafase II

MMLV: *Moloney Murine Leukemia Virus*

MVD: *Microvessel density*

µm: Micrómetro

ng: Nanogramos

n.s: No significativo

nm: Nanómetro

OMS: Organización Mundial de la Salud

PFA: Paraformaldehido

QT: Quimioterapia

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa

RNV: Recién nacido vivo

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Radioterapia

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa

SF: Congelación lenta (en inglés *slow freezing*)

SL: Sonia Lozano

SM: Susana Monzó

SSS: Suero sintético sustituido

TA: Temperatura ambiente

TBST: *Tris buffered saline with Tween*

TCO: Trasplante de corteza ovárica

TdT: Enzima desoxinuceotidil-trasferasa terminal

TMB: Tetrametilbencidina

TMR: Tetrametil rodamina

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

Tris-HCl: hidroximetil aminometano, ácido clorhídrico

TUNEL: Marcado final de corte de terminal deoxinucleotidil transferasa

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VT: Vitrificación

Vs: Versus

YAP: *Yes- associated protein*

II. Lista de figuras

Figura 1. Útero y anexos y estructuras de soporte.

Figura 2. Visión superior con peritoneo intacto.

Figura 3. Arteria de los genitales internos.

Figura 4. Corteza ovárica con folículos ováricos. Histología del ovario.

Figura 5. Mitosis celular.

Figura 6. Meiosis celular.

Figura 7. Disminución de la reserva folicular en función de la edad.

Figura 8. Clasificación folicular.

Figura 9. Estadios de la foliculogénesis en el ovario de mujer adulta.

Figura 10. Distribución por grupo diagnóstico de tumores infantiles en España.

Figura 11. Supervivencia a los 5 años del diagnóstico en pacientes prepúberes.

Figura 12. Vaso sanguíneo con engrosamiento e hialinización difusa de la pared y con estrechamiento de la luz.

Figura 13. Vaso sanguíneo sin estrechamiento de la luz

Figura 14. Proliferación cortical de pequeños vasos sanguíneos sin patrón organizativo.

Figura 15. Mecanismo de acción de la QT sobre el ovario

Figura 16. Esquema con las diferentes técnicas de preservación de fertilidad.

Figura 17. Resumen del diseño del estudio.

Figura 18. Descripción del contaje folicular.

Figura 19. Tipos de marcaje de ovocitos según TUNEL

Figura 20. Mecanismo de acción del amortiguador de fluorescencia.

Figura 21. Modelo de RT-qPCR.

Figura 22. Esquema de los diferentes grupos experimentales en estudio in vivo.

Figura 23. Preparación de los reactivos.

Figura 24. Configuración de la placa.

Figura 25. Densidad de folículos primordiales en cada uno de los grupos.

Figura 26. Densidad de folículos primarios en cada uno de los grupos.

Figura 27. Imágenes de TUNEL en cada uno de los grupos.

Figura 28. Imagen TUNEL en los folículos.

Figura 29. Concentración de TNF- α en medio de cultivo en los diferentes grupos

Figura 30. Expresión relativa de genes de la ruta Hippo tras los diferentes procedimientos de decorticación.

Figura 31. Diagrama de cajas y bigote para densidades foliculares totales. Muestras in vivo.

Figura 32. MVD expresada como diagrama de cajas y bigotes para cada grupo.

Figura 33. Imágenes tinción tricrómica de Masson a 20X (aumentos). Muestra el colágeno en azul y núcleos en rosa/rojo.

Figura 34. Área fibrótica expresada como diagrama de cajas y bigotes para cada grupo.

Figura 35. Niveles de estradiol en plasma de las ratonas, expresados como diagrama de cajas y bigotes.

III. Lista de tablas

Tabla 1. Estimación de incidencia de cáncer en España en mujeres en 2014 por tipo tumoral.

Tabla 2. Efectos secundarios de los tratamientos antineoplásicos.

Tabla 3. Prevalencia de FOP en supervivientes.

Tabla 4. Incidencia de amenorrea tras uso de diferentes protocolos en cáncer de mama.

Tabla 5. Reserva ovárica en pacientes supervivientes de neoplasias en comparación con controles.

Tabla 6. Resumen de muestras sometidas a estudio in vitro.

Tabla 7. Resumen de muestras sometidas a estudio in vivo.

Tabla 8. Datos de los cebadores utilizados.

Tabla 9. Resumen de las muestras pipeteadas.

Tabla 10. Tamaño y espesor de los fragmentos.

Tabla 11. Medianas (IQR) de normalidad folicular en los diferentes grupos.

Tabla 12. Densidades foliculares en los diferentes grupos expresados como medianas (IQR).

Tabla 13. Porcentaje de folículos quiescentes y en crecimiento expresados como mediana (IQR) para cada grupo.

Tabla 14. Cuantificación TUNEL en folículos y estroma.

Tabla 15. Caspasa 3 activada medida mediante qPCR en estroma

Tabla 16. Valores de $\Delta\Delta Ct$ para cada grupo.

Tabla 17. Valores de fold change para HSP-60 en los diferentes grupos.

Tabla 18. Densidades foliculares por subpoblaciones. Muestras In vivo

Tabla 19. Poblaciones foliculares. Muestras in vivo

Tabla 20. Estatus del estroma ovárico tras xenotrasplante. Valores expresdos como mediana (IQR).

1. Introducción

1.1 Aparato reproductor femenino: los ovarios.

1.1.1 Anatomía

Los ovarios son dos estructuras ovoideas y bilaterales (uno a la derecha y otro a la izquierda del útero) de entre aproximadamente 3-5 cm de largo (en la mujer adulta). Se encuentran en la cavidad pélvica, de color entre blanco y grisáceo, brillante, y cuya superficie se encuentra ligeramente irregular por las cicatrices ovulatorias y los folículos de superficie[1].

El ovario presenta como medios de inserción 4 ligamentos [2]:

- Ligamento del ovario o ligamento útero-ovárico: se inserta en el ángulo superior del útero (por encima de la Trompa de Falopio) hasta la parte inferior del borde anterior del ovario. Asegura la orientación del ovario y mide aproximadamente 30-35mm (figura 1).
- Ligamento tubo-ovárico: no es en realidad un auténtico medio de fijación, sino que asegura el contacto entre el pabellón tubárico y el ovario.
- Mesovario: une el ovario a la hoja posterior del ligamento ancho. Se detiene antes de llegar al hilio ovárico por lo que el ovario en toda su extensión no está recubierto de peritoneo.
- Ligamento suspensorio: es el medio de fijación más eficaz. Une el ovario a la pared posterior del abdomen.

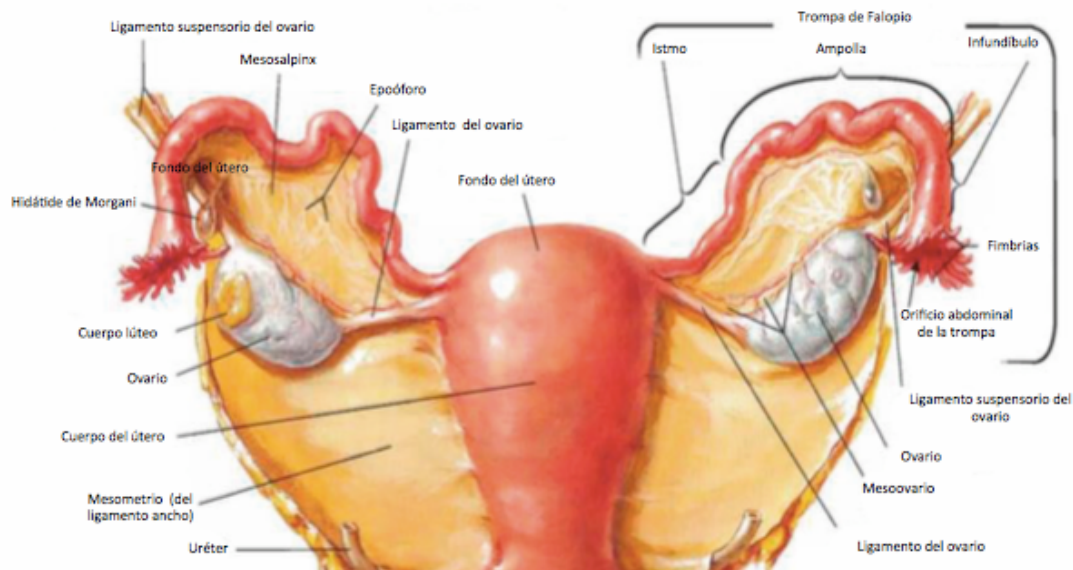


Figura 1. Útero y anexos y estructuras de soporte. Lámina 371 [2].

Además, los ovarios están relacionados con [2]:

- La cara interna está relacionada y cubierta por el mesosalpinx y la Trompa de Falopio.
- La cara externa se relaciona con la fosita ovárica (depresión del peritoneo) que a su vez está relacionada con:
 - Por delante con la inserción del ligamento ancho.
 - Por detrás por el uréter y los vasos hipogástricos.
 - Por arriba por los vasos ilíacos externos.
 - Por debajo del peritoneo por los vasos y el nervio obturador.
- El borde anterior se encuentra adherido al ligamento ancho, formando el mesovario. Este borde constituye el hilio ovárico, pues es por donde le llega el paquete vascular y nervioso.
- El borde posterior está en contacto con los mismos elementos que delimitan la parte posterior de la fosita ovárica (uréter y vasos hipogástricos).
- El borde inferior puede quedar por encima del suelo pélvico o puede descender hasta encontrarse en el fondo de saco de Douglas.

- El borde superior da la inserción del ligamento suspensorio, así como del ligamento tubo-ovárico (figura 2).

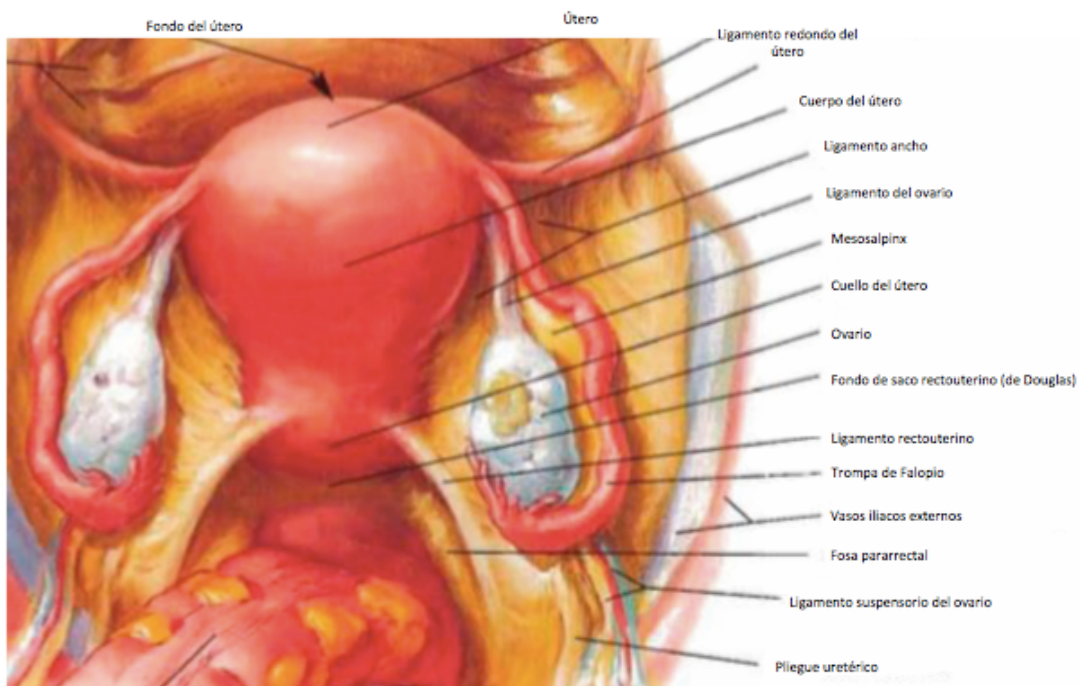


Figura 2. Visión superior con peritoneo intacto. *Lámina 369* [2].

La vascularización ovárica, procede principalmente de la arteria ovárica [3] la cual procede de la aorta descendente, alcanzando el ovario a través del ligamento infundíbulo-pélvico, donde da la rama tubárica que se anastomosa con la circulación uterina. No obstante, a veces podemos encontrar variaciones anatómicas que son consideradas variaciones normales (como que la arteria ovárica izquierda proceda de la arteria renal) (figura3).

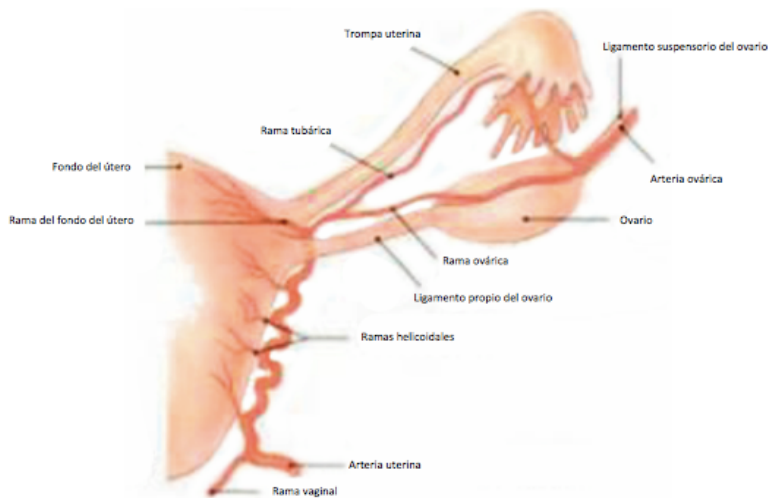


Figura 3. Arteria de los genitales internos [3]. Obsérvese la arteria ovárica.

1.1.2. Histología

El ovario se encuentra envuelto por un epitelio cúbico simple superficial, (continuación del mesotelio que recubre el mesoovario), y presenta dos regiones bien diferenciadas [4]:

- Médula (parte central): colección celular heterogénea, formada por tejido conectivo laxo de sostén. Contiene vasos sanguíneos, linfocitos y nervios.
- CórTEX (parte periférica) (figura 4): a su vez está formada por el estroma cortical y los folículos ováricos.
 - o *Estroma cortical*: presenta una capa más superficial de tejido conectivo denso (túnica albugínea) y una capa de tejido conectivo laxo con gran cantidad células y con predominio de fibroblastos que rodean a los folículos ováricos.
 - o *Los folículos ováricos*: son las estructuras fundamentales en cuanto a fertilidad se refiere (puesto que contienen al óvulo) y van a sufrir una serie de cambios para su correcto desarrollo y diferenciación. Hay que destacar dos tipos de células importantes durante el desarrollo folicular (que explicaremos más detalladamente a continuación) y encargadas principalmente de la función hormonal; las células de la teca y las células de la granulosa. Las células de la teca son las encargadas de la producción de andrógenos mientras que las células de la granulosa son las encargadas de transformar dichos andrógenos en estrógenos así como de la producción de progesterona tras la ovulación [5].

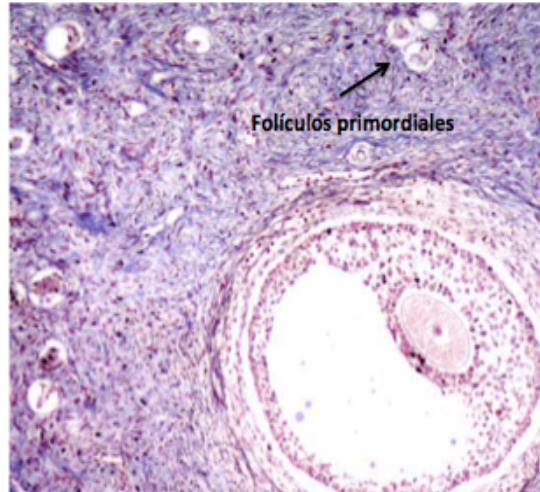


Figura 4. Corteza ovárica con folículos ováricos. Histología del ovario. Departamento de Anatomía Patológica. UV (Universitat de València).

1.1.3 Embriología

Entre 1000 y 2000 células germinales primitivas provenientes del endodermo del saco vitelino alcanzan la cresta germinal los primeros 45 días de la gestación. Se inicia entonces la formación, desarrollo y maduración de óvulos a partir de estas células germinales primordiales, lo que consta de varias fases [6]:

-Fase de proliferación: las células germinales primordiales se dividen mediante mitosis (figura 5) a partir de la 6ª semana de vida intrauterina, produciendo los ovocitos primarios (suelen haber unos 5-7 millones en la 20 semana, la cual supone su máximo desarrollo), que se rodean de células aplanadas para formar folículos primordiales. A partir del 5-6 mes de vida intrauterina disminuye el número de folículos primordiales por atresia hasta alcanzar unos 600.000-800.000 en el momento del nacimiento. Los ovocitos primarios inician la primera división meiótica y se detienen en fase de diploteno de la profase.

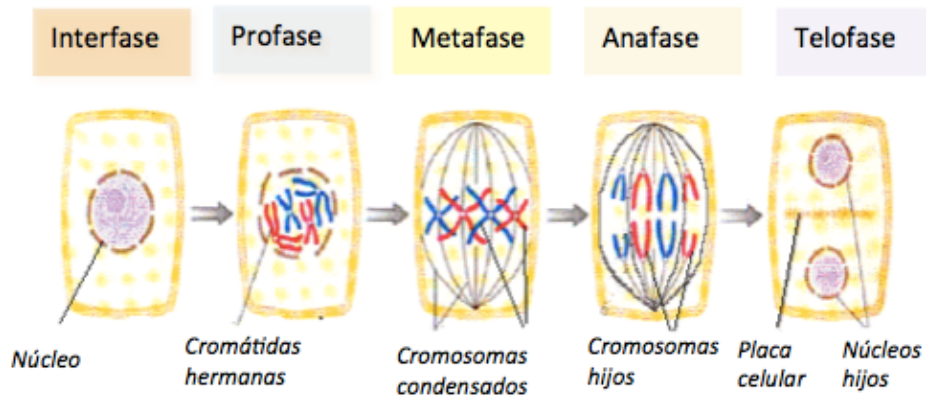


Figura 5. Mitosis celular. Obsérvese que células hijas poseen mismo número de cromosomas que la célula madre.

-Fase de diploteno de la meiosis: La meiosis inicia en el momento en que las células germinales primordiales se han diferenciado en ovocitos primarios (figura 6). Los ovocitos primarios se detendrán en el estadio de diploteno de la profase de la primera división meiótica. En la pubertad quedan aproximadamente entre 400.000 y 600.000. Se reiniciará su maduración en cada ciclo, y por tanto sólo unos 400 terminaran el proceso de maduración y ovulación.

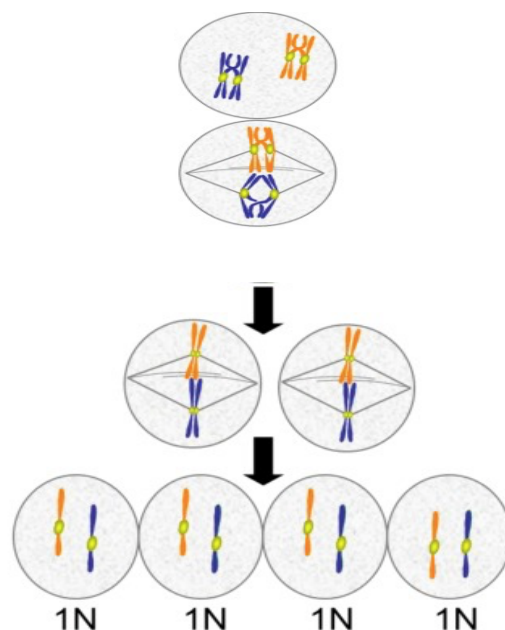


Figura 6. Meiosis celular. Obsérvese que cada célula hija contiene la mitad del material genético de la célula madre (célula haploide) [7] .

- *Fase de maduración:* El ovocito primario reanuda la primera división meiótica, formando un ovocito secundario y el primer corpúsculo polar. Seguidamente comienza la segunda división meiótica, la cual se detiene en metafase; solo si el ovocito secundario es fecundado, finalizará la división meiótica y se formará un óvulo maduro. Posteriormente el pronúcleo masculino y femenino se unirán para formar el cigoto.

1.1.4. Desarrollo folicular.

Como hemos comentado anteriormente, las células germinales se multiplican hasta alcanzar 5-7 millones de folículos primordiales en la 20 semana de vida intrauterina, de los cuales solo entre 400.000- 600.000 folículos primordiales permanecerán en la menarquia [8] .

Existe una disminución progresiva tanto en calidad como en cantidad ovocitaria a lo largo de la vida [9]. Se trata de un envejecimiento fisiológico que viene determinado por una disminución gradual de los folículos presentes en la corteza ovárica, y que a la larga conllevará esterilidad natural y finalmente menopausia [10].

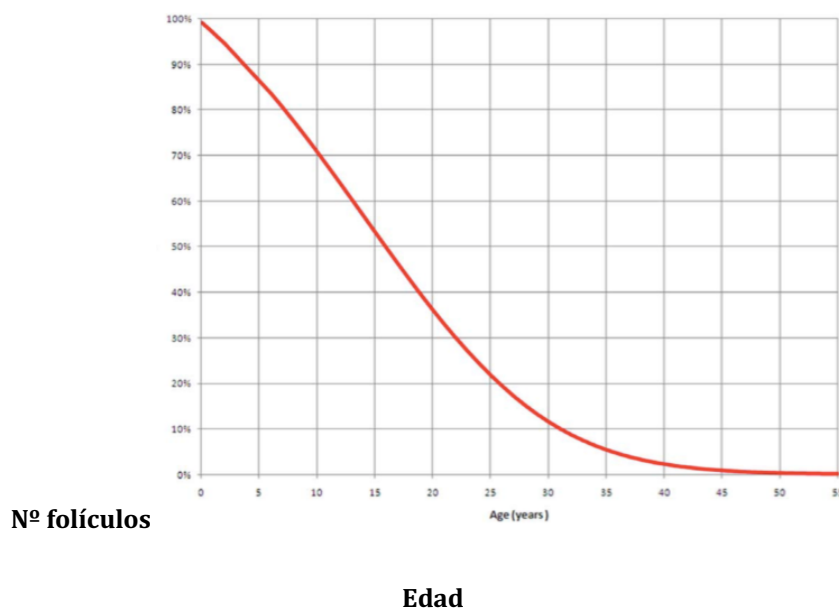


Figura 7. Disminución de la reserva folicular en función de la edad [11].

Para comprender el envejecimiento fisiológico y la disminución de la reserva ovárica (figura 7), debemos entender bien el complejo proceso de la foliculogénesis: el paso del folículo de un estadio a otro, en función del número de las células de la granulosa y de su tamaño [12]. No obstante, cabe recalcar que los factores desencadenantes del crecimiento y desarrollo folicular no están todavía claramente establecidos [13].

Es importante destacar que miles de folículos primordiales y primarios (de los que hablaremos a continuación, figura 8) que iniciaran su camino de mitosis y proliferación, sufrirán un proceso de atresia cuando no sean el folículo de mayor tamaño [12]. Así pues, la atresia es la causante de la pérdida de más del 90% de los folículos que entran en crecimiento [14].

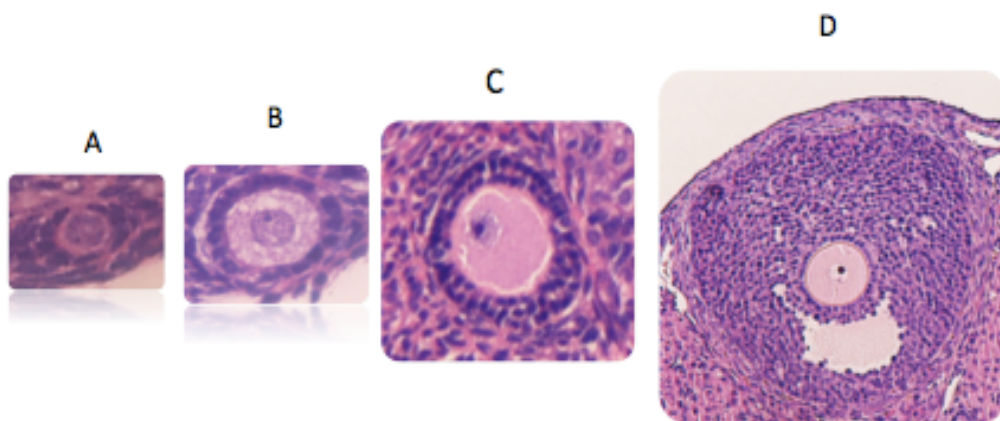


Figura 8. Clasificación folicular. A- folículo primordial, B-folículo primario, C-folículo secundario y D-folículo antral.

Los folículos primordiales (figura 8- A) tienen $\approx 30 \mu\text{m}$ de diámetro. El ovocito presenta un núcleo grande, con cromatina dispersa y se encuentran rodeados de una única capa aplanada de células de la granulosa [15].

Los folículos primarios (figura 8-B) tienen un tamaño aproximado de $\approx 50 \mu\text{m}$ de diámetro. Su principal característica es la capa de células cuboidales de la granulosa que lo rodea [15].

Los folículos secundarios (figura 8-C) tienen un tamaño mayor, de aproximadamente $\approx 90 \mu\text{m}$ y presentan más de una capa de células cuboidales

de la granulosa [15]. Se ha identificado que a medida que el folículo se agranda, el tejido conjuntivo circundante se estratifica y puede ser dividido en dos partes: la teca interna y la teca externa, aunque las capas de la teca definitivas solo aparecen cuando el folículo presenta entre 3 y 6 capas de células de la granulosa [13].

Cuando en la teca interna, algunas células precursoras de tipo fibroblasto se transforman en células epitelioides el folículo se denomina folículo preantral (clase 1) [13].

El folículo antral viene definido por la aparición de una cavidad antral llena de líquido. Gracias a la acumulación de líquido en la cavidad antral y el desarrollo de las células de la teca interna y de las células de la granulosa el folículo va progresando (de la clase 2 a la 3 y posteriormente a la clase 4) hasta alcanzar un tamaño de 2mm (figura 8-D).

Los folículos antrales con un tamaño entre 2-5mm (clase 5), se observan en todas las etapas del ciclo, son los llamados folículos seleccionables (figura 9). Aquellos que estén presentes durante la última fase lútea formarán la población de la cual se seleccionará el folículo ovulatorio en el ciclo siguiente [16]. Estos folículos, presentan una mayor actividad aromataza sensible a FSH (Hormona Folículoestimulante) en sus células de la granulosa, lo que se traducirá en una potente estimulación [17].

Los folículos antrales con un tamaño entre 5-9mm se denominan de clase 6. Adquieren su tamaño en la fase folicular temprana [18].

Pero no todos los folículos poseerán la misma capacidad para pasar de un estadio a otro, sino que aquellos más capacitados serán los que posean un mayor grado de maduración de la teca interna [19].

Solo un folículo tendrá al inicio de la fase folicular una cantidad detectable de FSH y estradiol-17 β [20], y este será el folículo de clase 6. Dicho folículo seleccionado, será además el que mayor número de células de la granulosa posea. Su tamaño oscilará entre 5-9mm [18].

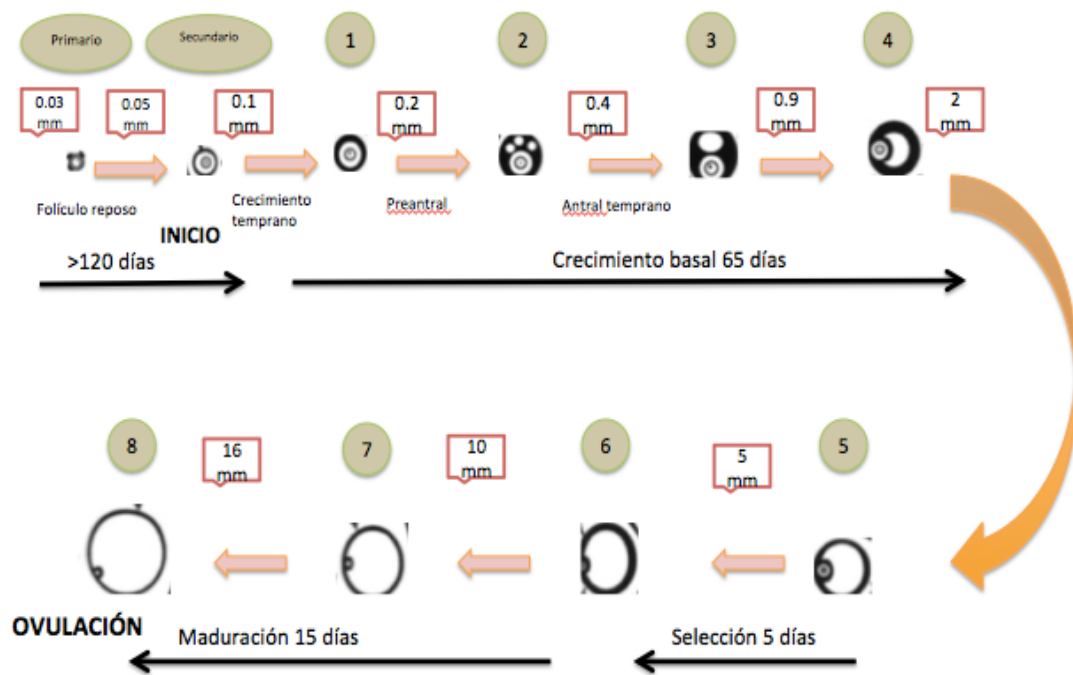


Figura 9. Estadios de la foliculogénesis en el ovario de mujer adulta [13].

A pesar de todos estos cambios, es en la fase final donde observaremos las mayores transformaciones: el paso a folículo preovulatorio temprano (folículo de clase 7) conlleva un aumento significativo de su tamaño que pasará a ser de entre 10 a 16mm, así como un aumento del acúmulo de líquido folicular (formado por ácido hialurónico, esteroides y factores de crecimiento) en el antro. Se produce también una hipertrofia de la teca interna y un aumento del estradiol en el plasma sanguíneo gracias a la actividad de las células de la granulosa [21].

Finalmente el folículo preovulatorio (folículo de tipo 8), presenta un tamaño superior a 16mm y unas células de la granulosa que ya no proliferan [21]. Además se convierte en una estructura altamente vascularizada ya que el área de la teca interna se encuentra ocupada por vasos sanguíneos dos veces más grandes que los vasos presentes en otros folículos [22].

Será el aumento brusco de LH (Hormona Luteinizante) el que provocará que se reanude tras 12-24 horas la primera división meiótica del ovocito primario (detenido en profase I) y se producirá entonces el ovocito

secundario y un corpúsculo polar. Posteriormente el ovocito secundario iniciará la segunda división meiótica y se detendrá en Metafase II [23].

1.2. Enfermedades neoplásicas.

1.2.1. Definición:

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) «Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo [24]; La característica principal del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer (se calculan 8,2 millones de muertes relacionadas directamente por el cáncer en 2012)[25].

1.2.2. Epidemiología

En 2012 se diagnosticaron unos 14 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo y se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas [25].

1.2.2.1. Epidemiología en mujeres jóvenes y adultas.

La incidencia global de cáncer en mujeres en España es similar a la de los países de su entorno, y aunque la tendencia es un aumento de la incidencia, en los últimos 20 años se ha estabilizado [26, 27] (tabla 1).

Como podemos observar, el cáncer de mama supone la neoplasia más frecuente. En nuestro país se diagnostican cerca de 25.000 casos anuales [28]. Es además la neoplasia más mortal entre las mujeres con edades comprendidas entre 20 y 59 años a nivel mundial [29].

Tipo tumoral	Nº casos	Tasa bruta	Tasa ajustada población mundial	Tasa ajustada población europea
Mama	26.354	1,3	0,7	1,0
Colorrectal	16.071	68,1	27,7	41,1
Linfoma no Hodgkin	3315	14,1	6,9	9,5
Linfoma Hodgkin	669	2,8	2,6	2,7

Tabla 1. Estimación de incidencia de cáncer en España en mujeres en 2014 por tipo tumoral[28].

1.2.2.1. Epidemiología del cáncer infantil.

En cuanto a la incidencia de cáncer infantil/prepuberal, en España se estima 155,5 casos nuevos anuales por millón de niños, con un incidencia por tipo de tumores similar al resto de Europa [30].

Además, la localización y la histología de los diferentes subtipos de neoplasias en la infancia difieren con respecto a la edad adulta; mientras en las mujeres adultas hay un claro predominio de cánceres epiteliales como la mama, en la infancia son predominantes los cánceres de estirpe hematopoyética y embrionario-mesenquimal [30](figura 10).

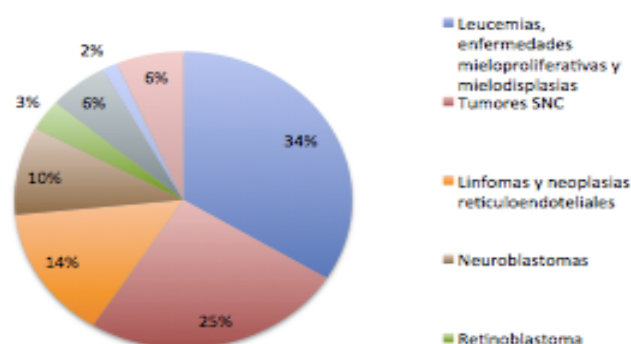


Figura 10. Distribución por grupo diagnóstico de tumores infantiles en España [30].

1.2.2.3. Supervivencia.

Pese a los datos globales de mortalidad, la supervivencia a los 5 años en pacientes jóvenes (por debajo de los 45 años) se ha incrementado hasta un 84% [31].

Si nos centramos en paciente prepúberes, la tasa de supervivencia supone un 80% a los 3 años de seguimiento y un 77% a los 10 años [32] (figura 11).

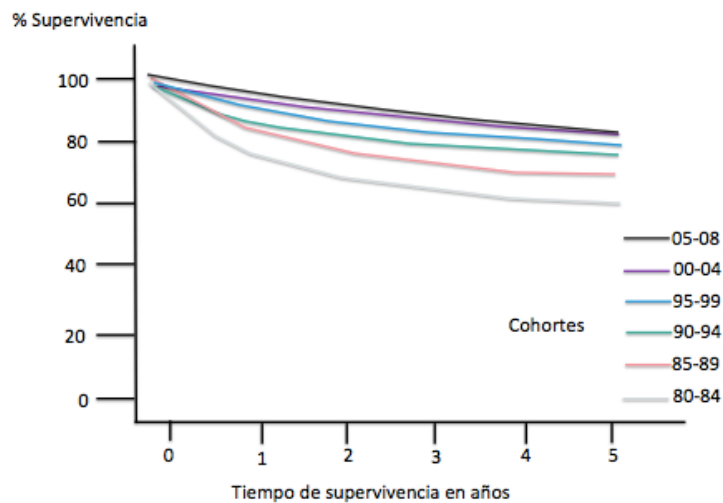


Figura 11. Supervivencia a los 5 años del diagnóstico en pacientes prepúberes. [32].

Este incremento de la supervivencia se encuentra relacionado en ocasiones con tratamientos antineoplásicos más agresivos; y a su vez, dichos tratamientos quimio y radioterápicos pueden ocasionar efectos deletéreos tanto a nivel sistémico como sobre el ovario [33, 34] que se desarrollaran en el siguiente apartado.

1.3. Efectos secundarios de los tratamientos antineoplásicos

En la actualidad, los objetivos de curación conllevan no solo una recuperación completa sino también una buena calidad de vida y una reintegración plena, por lo que existe una comisión nacional para el seguimiento de estos efectos secundarios [35]. Para ello es importante adecuar protocolos para conseguir menores tasas de toxicidad manteniendo las mismas tasas de supervivencia

[36], así como el poder ofrecer técnicas profilácticas que eviten estos efectos adversos [37].

1.3.1. Efectos secundarios a nivel sistémico

Son innumerables los efectos deletéreos de dichos tratamientos, por lo que a continuación se expone una tabla resumen (tabla 2) con los principales órganos afectados y los efectos secundarios provocados, así como las principales patologías donde son utilizados los agentes quimioterápicos y los factores de riesgo añadidos [38].

Así por ejemplo una secuela importante es la cardiotoxicidad producida por irradiación mediastínica o por determinados agentes como las antraciclinas lo que se puede traducir en derrames pericárdicos o miocardiopatías. Otros agentes como la bleomicina o el metrotexato puede provocar fibrosis pulmonar y la radiación de cabeza y cuello con metaidobencilguadina puede provocar alteración de la función tiroidea[39, 40]. Un efecto importante y que supone una complicación grave del tumor infantil es la aparición de una segunda neoplasia[41].

Alteración orgánica	Efectos tardíos	Terapia	Factores de riesgo	Grupo diagnóstico
Corazón	Cardiomiopatías	Doxorrubicina	Sexo femenino	Linfoma de Hodgkin
	Arritmia	Idarubicina	Altas dosis de QT	Linfoma no Hodgkin
	Fibrosis pericárdica		Uso combinado con RT	Leucemias Sarcomas
Pulmón	Fibrosis pulmonar	Bleomicina	Altas dosis de QT	Tumor cerebral
	Neumonía intersticio	Busulfán	Combinación con RT	Linfoma de Hodgkin
Riñón	Insuficiencia renal	Ifosfamida	Ifosfamida dosis >60g/ m ²	Tumor de Wilms
	HTA	Cisplatino		Hepatoblastoma
	Afectación glomerular	Carboplatino	Cisplatino dosis >200mg/m ²	Neuroblastoma
	Afectación tubular			
Neuro-cognitivo	Memoria	Metrotexato	Sexo femenino	Tumor cerebral
	Cambios conducta	Irradiación cerebral	Tumor supratentorial	Leucemia aguda linfoblásticas
			Dosis irradiación >24Gy	Sarcomas
Neuro-sensorial	Hipoacusia	Cisplatino	Dosis cisplatino >300mg/ m ²	Tumor células germinales
	Otoesclerosis	Carboplatino		
	Defectos visuales	Vincristina	Radiación sobre oído >30Gy	Leucemias
	Glaucoma			Retinoblastoma Sarcoma
Neuro-motor	Neuropatía periférica motora	Vincristina		Tumor de Wilms
		Vinblastina		Sarcoma Neuroblastoma

Tabla 2. Efectos secundarios de los tratamiento antineoplásicos [38]. QT: quimioterapia; RT: radioterapia; Gy:Gray.

1.3.2. Efectos secundarios a nivel gonadal.

1.3.2.1 *Mecanismos.*

Los agentes quimioterápicos pueden causar daño en el ADN (Ácido desoxirribonucleico) así como alteraciones en las células germinales y en los folículos en desarrollo[42]. El riesgo de toxicidad viene influido tanto como por el agente quimioterápico, como por la dosis utilizada, así como la edad de la paciente [43].

La finalidad de los tratamientos antineoplásicos es inhibir la proliferación tumoral y para ello pueden actuar sobre la replicación del ADN, del ARN (ácido ribonucleico), sobre la síntesis proteica o sobre componentes citoplasmáticos necesarios para la división celular como el citoesqueleto o los microtúbulos [44].

Estudiar los efectos deletéreos de cada uno de los agentes quimioterápicos es muy complejo, debido como hemos nombrado con anterioridad a la multitud de factores que implican [43]. Las alteraciones gonadales pueden ser debidas tanto a la QT (quimioterapia) como a la RT (radioterapia) y como a la propia cirugía [37].

En general se considera que los fármacos más gonadotóxicos son los AA (agentes alquilantes). Impiden la replicación del ADN y la transcripción del ARN debido a su gran afinidad por ADN y por las proteínas, actuando en cualquier fase del ciclo celular [44]. Los complejos de platino no son AA pero presentan una acción parecida.

El mecanismo por el cual los agentes alquilantes dañan de manera irreversible las gónadas femeninas no está claro [45]. Parece que la apoptosis de los folículos es una de las principales causas de este daño, pero serían necesarios más trabajos para dilucidar si la apoptosis se produce de manera directa sobre el ovocito o como consecuencia del daño provocado en las células de la granulosa [46].

La fibrosis cortical y la lesión de los vasos sanguíneos también parecen tener un papel importante en el FOP (fallo ovárico precoz) [47]. Se produce una hialinización del estroma cortical, fibrosis de la capa íntima y engrosamiento de la capa muscular (figura12 y figura 13).

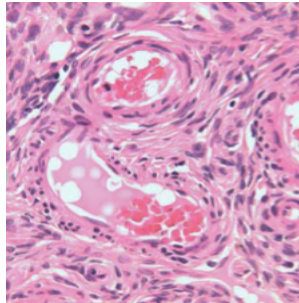


Figura 12. Vaso sanguíneo con engrosamiento e hialinización difusa de la pared y con estrechamiento de la luz [47].

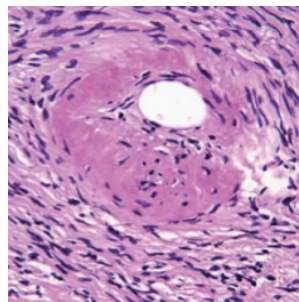


Figura 13. Vaso sanguíneo sin estrechamiento de la luz (no ha sido sometido a QT)[47].

Dichos cambios, como hemos mencionado, conllevan un estrechamiento de la luz vascular y una proliferación de neovasos sin ninguna patrón organizador, para intentar cubrir esa carencia de aporte sanguíneo (figura 14).

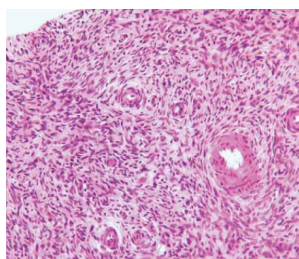


Figura 14. Proliferación cortical de pequeños vasos sanguíneos sin patrón organizativo.

También existen estudios que hablan de la pérdida de la reserva ovárica debido a un agotamiento folicular provocado por una activación masiva de los folículos que inician un camino irreversible y unidireccional hacia la atresia [48]. La activación de la vía PTEN/PI3K/Akt tiene como consecuencia la iniciación de la maduración folicular [49] y se ha descrito que determinados quimioterápicos como la ciclofosfamida provocan cambios en dicha ruta [50].

Es por tanto que el daño actúa de manera global, tanto por apoptosis directa sobre los folículos y/o células de la granulosa, como por la interrupción del ciclo germinal normal [51], así como por el daño en la vascularización del órgano y el agotamiento provocado por la activación folicular masiva [52] (figura 15).



Figura 15: Mecanismo de acción de la QT sobre el ovario [52]

En cuanto a los agentes no alquilantes, la mayoría son dependientes del ciclo celular, por lo que teóricamente afectarían a las células que se encuentran replicándose.

La RT también causa efectos dañinos sobre las gónadas. Los efectos de la RT sobre la función ovárica dependerán de [53]:

- Edad de la paciente
- Cantidad total de radiación recibida
- Dosis diarias de tratamiento
- Campo de tratamiento

Se considera que una radiación de 4 a 6 Gy (gray) en adultos y de 10 a 20 Gy en niños está asociada a fallo ovárico permanente [54]. Una radiación de 2Gy provoca aproximadamente la pérdida de la mitad de los folículos en crecimiento [55].

Parece ser que el daño folicular se inicia con la muerte de las células de la granulosa en división [56]. Es por ello que los folículos primordiales en reposo serán más resistentes a la RT que aquellos que se encuentren en estados madurativos más avanzados [57]. Pero el perjuicio no solo se produce en el propio ovocito y en las células de la granulosa; también podemos encontrar un daño en el estroma ovárico y en la vascularización lo que producirá una atrofia del tejido y fibrosis ovárica [45, 56].

También se ha observado que la irradiación uterina durante la infancia puede predisponer en un futuro mayor riesgo de aborto, parto pretérmino y a recién nacidos con bajo peso [58]. Además, las pacientes que fueron sometidas a RT abdominal presentan un volumen uterino disminuido, así como un grosor endometrial menor [59], lo que podría estar provocado por un daño en la vascularización uterina [45].

1.3.2.2 *Efectos clínicos.*

La edad media actual en que las pacientes gestan por primera vez en España es 30.4, y en Europa de 28.7 años [60]. Este aumento de edad, especialmente en países desarrollados, se debe en parte a un mejor uso de los métodos anticonceptivos, así como a causas sociales. Es por ello que en el momento del diagnóstico de la enfermedad muchas pacientes no han cumplido su deseo genésico[61]. Dado que un embarazo después del tratamiento del cáncer no parece condicionar el pronóstico de la enfermedad, muchas optan por cumplir sus deseos genésicos tras el periodo libre de enfermedad. No obstante, no se debe olvidar que tanto la radiación como determinados agentes quimioterápicos pueden provocar un FOP (fallo ovárico precoz) [34, 62, 63].

Consideramos Fallo Ovárico Precoz, a una disfunción del ovario como órgano reproductor y hormonal, lo cual puede ir asociado a patología esquelética (como la osteoporosis), vasomotora y cardiovascular y a problemas genitourinarios[64]. Para poder llegar al diagnóstico, la paciente debería presentar amenorrea durante al menos 1 año, o oligoamenorrea con elevación de gonadotropinas y descenso del estradiol sanguíneo [65].

El riesgo de FOP viene influido por múltiples factores[43]. Las pacientes tratadas en combinación con agentes alquilantes más RT tienen un riesgo mayor de padecer FOP, así como aquellas que recibieron dosis mayores de 10 Gy.

La radiación abdominal en dosis de 20-30 Gy produce un fallo ovárico permanente en el 72% de las pacientes prepúberes y en el 97% de las pacientes mayores de 40 años[47]. Como hemos comentado, se estima que se produce una pérdida aproximadamente 50% de la cohorte de folículos con una radiación de 2 Gy [66], y numerosos estudios reflejan un mayor riesgo elevado de parto pretérmino, aborto y recién nacidos de bajo peso en pacientes que fueron sometidas a RT abdominal [56].

Como también ya se ha mencionado, existen múltiples factores que determinaran el resultado final del efecto de los agentes antineoplásicos sobre las gónadas. No obstante existe una reciente revisión, donde la prevalencia de FOP puede variar de un 2.1% hasta un 82.% en supervivientes de neoplasias pediátricas, adolescentes y adultos jóvenes[67] (tabla 3)

Estudio	Nº pacientes	Neoplasia	Prevalencia FOP
Livesey et al, 1990 (UK)	67	Tumor cerebral	26,8%
Byrne et al, 1992 (USA)	954	Varios	42%
Mackie et al, 1996 (UK)	32	Linfoma Hodgkin	31,25%
Teinturier et al, 1998 (Francia)	21	85.7% tumor sólido; 14.3% hematológicos	57,1%
Chiarelli et al, 1999 (Canadá)	719	60.1% tumor sólido; 39.9% hematológicos	8.8%
Larsen et al, 2003 (Dinamarca)	100	37% tumor sólido; 63% hematológicos	17%
Sklar et al, 2006 (US, Canadá)	2819	45% tumor sólido; 55% hematológicos	15%
Mansky et al, 2007 (USA)	15	Sarcomas	49%
Green et al, 2009 (US, Canadá)	2819	No descrito	8%
Thomas- Teinturier et al 2013 (Francia)	706	85% tumor sólido; 15% hematológicos	2.1%
Hudson et al, 2013 (USA)	880	35,4% tumor sólido; 64.6% hematológicos	31.9%
Raciborska et al, 2015 (Polonia)	27	Sarcoma de Ewing	67%
Raciborska et al, 2015 (Polonia)	27	Sarcoma de Ewing	67%
DeWire et al, 2015 (USA)	30	Primario del sistema nervioso central	82.8%
Salih et al, 2015 (USA)	222	Varios	14%
Elchuri et al, 2016 (USA)	49	47% tumor sólido; 53% hematológicos	10.2%
Wilson et al, 2016 (USA)	436	Varios	11%
Chemaitilly et al, 2017 (USA)	921	38.9% tumor sólido; 61.1% hematológicos	10.9%

Tabla 3. Prevalencia de FOP en supervivientes [67].

Se puede observar las grandes diferencias en cuanto a tipo de neoplasia y prevalencia del FOP siendo por ejemplo la prevalencia de FOP de un 82.8% para tumores primarios del sistema nervioso central y de un 31,25% para el Linfoma de Hodgkin. Es importante remarcar que el FOP iatrogénico puede ser transitorio, es decir una disfunción ovárica no es sinónimo de una infertilidad permanente y completa [68].

En cuanto al cáncer de mama, muy prevalente en mujeres jóvenes, también existen muchas diferencias en cuanto al porcentaje final de amenorrea [69] dependiendo de (tabla 4):

- Tipo de agente quimioterápicos,
- Ciclos de QT
- Edad de la paciente

Estudio	Nº Pacientes	Fármaco	Meses tratamiento	Porcentaje amenorrea
Goldhirsch 1990	541	CMF	1	14% (<40 años) 34% (>40 años)
Goldhirsch 1990	387	CMF	6	33% (<40 años) 81% (>40 años)
Bines 1996	3628	CMF	3-24	40% (<40 años) 76% (>40 años)
Petrek 2006	83	CMF	8	82%
Martin 2005	403	FAC		52.4%
Petrek 2006	120	AC	4	53%
Tham 2007	75	AC	4	44% (<40 años) 81% (>40 años)
Martin 2005	420	ACD	6	61,7%

Tabla 4. Incidencia de amenorrea tras uso de diferentes protocolos en cáncer de mama.

CMF: Ciclofosfamida, Metrotexato y Fluoracilo. FAC: Fluoracilo, Adriamicina y Ciclofosfamida
AC: Adriamicina y ciclofosfamida. ACD: Adriamicina, Ciclofosfamida y Docetaxel

Además se han utilizado varios métodos para determinar la reserva ovárica en mujeres supervivientes tras una neoplasia basándose en el recuento de folículos antrales, la hormona antimulleriana y el volumen ovárico.[70]

A continuación expongo una tabla-resumen con 10 estudios que valoran la reserva ovárica en supervivientes y donde se observa una disminución de la misma tras los tratamientos gonadotóxicos [67] (tabla 5).

Estudio	Neoplasia	Método medida	Resultado
Bath et al, 2003 (UK)	45% tumor sólido 55% hematológico	Análisis hormonales Ecografía transvaginal	Supervivientes presentan niveles de FSH más elevados y de AMH descendidos Vs controles Volumen ovárico <
Larsen et al 2003 (Dinamarca)	48% tumor sólido 52% hematológico	Análisis hormonales Ecografía transvaginal	Supervivientes presentan volumen ovárico menor y disminución de RFA
Lie Fong et al,²⁹ 2009 (Netherlands)	46% tumor sólido 54% hematológico	Análisis hormonales Ecografía transvaginal	En 27% de supervivientes, los niveles de AMH estuvieron por debajo del percentil 10 en comparación con controles
Brougham et al, 2012 (UK)	Varios	Análisis hormonales seriados	AMH decrece progresivamente durante la QT, siendo indetectable en 50% de pacientes
Nielsen et al, 2013 (Dinamarca)	42.3% tumor sólido 57.7% hematológico	Análisis hormonales Ecografía transvaginal	Las supervivientes presentaron un menor RFA, pero no diferencias en cuanto a AMH
Krawczuk-Rybak et al, 2013 (Polonia)	59% tumor sólido 41% hematológico	Análisis hormonales	AMH fue más baja en las 83 supervivientes

Charpentier et al, 2014 (Canadá)	59% sólido 41% hematológico	tumor	Análisis hormonales	34.8% presentaban una AMH baja
Thomas-Teinturier et al, 2015 (Francia)	61% sólido 39% hematológico	tumor	Análisis hormonales Ecografía transvaginal	Supervivientes presentaban menor volumen ovárico y menores niveles de AMH
Salih et al, 2015 (USA)	Varias (Leucemia linfoblástica aguda)	(25%	Análisis hormonales	69% FSH <10 14% FSH >40
Krawczuk-Rybak et al, 2013 (Polonia)	Varios		Análisis hormonales	AMH fue menor en las pacientes de alto riesgo que en las controles y las de bajo/intermedio riesgo

Tabla 5. Reserva ovárica en pacientes supervivientes de neoplasias en comparación con controles.

Importante recalcar que aunque el nivel de AMH se puede correlacionar con el daño ovárico tras los tratamientos antineoplásicos [71], no necesariamente predice la posibilidad de recién nacido vivo [72]. Pero sí que se ha observado que la tasa de gestación en supervivientes es más baja en comparación con controles [73, 74].

Es por tanto muy necesario explicar con claridad que la función ovárica y fertilidad tras el cáncer es incierta y que debido a ello la preservación de la fertilidad debe buscarse idealmente antes de iniciar el tratamiento antineoplásico si la paciente lo desea [67].

1.4. Técnicas de preservación de la fertilidad

A día de hoy disponemos de diferentes mecanismos de preservación de la fertilidad dependiendo sobre todo de la edad de la paciente, del tiempo disponible para realizarlo y del tipo de tumor que se trate [75] (figura 16):

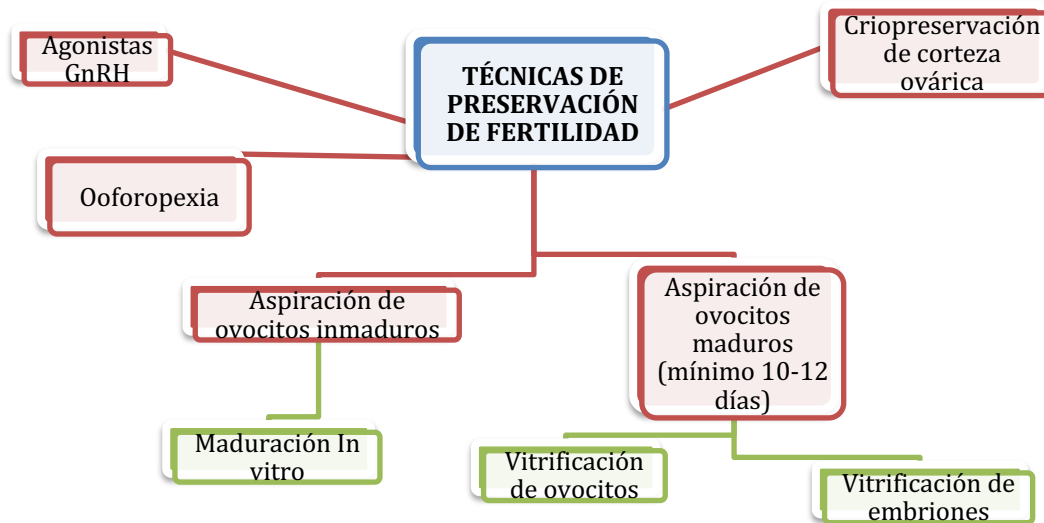


Figura 16. Esquema con las diferentes técnicas de preservación de fertilidad.

1.4.1 Análogos de hormona liberadora de gonadotropina

La estrategia de usar análogos de hormona liberadora de gonadotropina (en inglés Gonadotropin-Relasing Hormone”, GnRH) para preservar la fertilidad en pacientes sometidas a un tratamiento antineoplásicos es controvertido. Por una parte, el uso de GnRH podría proteger a los folículos en crecimiento (que suponen aproximadamente un 10% de la población folicular) de los efectos tóxicos de los fármacos antineoplásicos ya que crea un estado hipogonadotropo similar a la etapa prepuberal. No obstante no está demostrado que se encuentren receptores para la GnRH en los folículos primordiales ni preantrales, por lo que está protección supondría solo una protección a corto plazo [76].

Aun así, existen numerosos estudios a favor del efecto protector de la GnRH en la preservación de la fertilidad [77].

En un metaanálisis publicado recientemente [78] en el que se incluyeron 13 estudios, se observó que el uso de agonistas de la GnRH tuvo un efecto

beneficioso. Las pacientes que lo llevaron tuvieron menor riesgo de amenorrea y FOP con respecto a las que no fueran tratadas con el agonista.

La tasa de gestación espontánea en mujeres que recibieron QT + análogos de la GnRH Vs (versus) las que recibieron únicamente QT también fue mayor [78, 79].

No obstante la evidencia presentaba una baja calidad, debido al breve periodo de seguimiento y a la carencia de evaluación objetiva de la reserva ovárica [78].

1.4.2 Ooforopexia

La transposición de los ovarios (ooforopexia) consiste en movilizar los ovarios previa sección del ligamento útero-ovárico para dejarlos fuera del campo de irradiación. Se ha utilizado con éxito desde hace más de 35 años en pacientes con linfoma de Hodgkin que iban a recibir RT pélvica [80].

Pero este proceso no protege de los daños provocados por la QT sistémica [54] y por la tanto, se tiene que hacer una buena selección de pacientes según el tratamiento oncológico que vayan a recibir.

Se trata de un procedimiento quirúrgico que puede realizarse por laparotomía o por laparoscopia. Como todo procedimiento quirúrgico puede acarrear una serie de complicaciones como pueden ser las trombosis vasculares con el subsecuente compromiso del flujo sanguíneo ovárico e isquemia pudiendo implicar la pérdida de folículos [54]. También se han descrito casos de torsión ovárica [81].

Pese a los inconvenientes, se considera un proceso factible y seguro como método de preservación de fertilidad, ya que favorece el mantenimiento de la función ovárica y aumenta la posibilidad de gestación en el futuro [82].

1.4.3. Criopreservación de embriones

La criopreservación de embriones supone la primera técnica establecida

como método de PF (preservación de la fertilidad) y, a día de hoy sigue siendo junto con la criopreservación de ovocitos la técnica gold standard de PF en mujeres adultas. Pese a ello, en ciertos países debido a problemas éticos y legales, dicha técnica se encuentra restringida e incluso prohibida[83].

Fue en 1983 cuando se publicó el primer embarazo de un embrión criopreservado mediante congelación lenta [84].

La criopreservación de embriones puede llevarse a cabo mediante congelación lenta y mediante vitrificación, de hecho es mediante esta última técnica donde se han obtenido los mejores resultados [85].

Aunque los embriones pueden ser satisfactoriamente vitrificados en cualquier estadio del desarrollo preimplantacional [86], fue la vitrificación de un blastocisto la que dio lugar al primer embarazo y nacimiento en humanos en 2001 [87].

Dependiendo del sistema de vitrificación empleado, las tasas de supervivencia de embriones vitrificados pueden variar, pero con los métodos adecuados puede llegar a un 90% [88, 89]. Además, la tasa de embarazo acumulada es superior al 60% [90, 91]. Se debe tener también en cuenta que los resultados tras desvitrificación de embriones y transferencia en un ciclo sustituido de preparación endometrial son equivalentes a los resultados obtenidos en transferencias en fresco [92].

Otra ventaja que cabe destacar de la criopreservación de embriones como técnica de preservación de la fertilidad (al igual que también ocurre con la vitrificación de ovocitos), es que teóricamente se pueden lograr varios embarazos a partir de un único ciclo de estimulación ovárica controlada, lo que contribuiría un aumento del resultado acumulativo.

Pero, incluso con estos alentadores resultados, la criopreservación de embriones presenta diversas restricciones tales como la necesidad de la estimulación ovárica controlada y el retraso en el inicio del tratamiento

antineoplásico que ello conlleva, sin olvidar la contribución del esperma. Que se vincule en ese instante un factor masculino indica que las pacientes sin pareja masculina en ese momento deberían recurrir a un banco de esperma, así como ciertos problemas éticos relacionados con el destino de los embriones. Mencionar también las implicaciones que puede suponer que, una vez superada la patología oncológica haya roto la relación con la pareja que donó el gameto masculino y por tanto la paciente no pudiera disponer de los embriones criopreservados.

Todos estos hechos limitan la población candidata que pueda beneficiarse de este tipo de técnica ya que no permite su aplicación a mujeres jóvenes o adultas sin pareja, ni a aquellas que necesitan inmediatez para iniciar tratamiento antineoplásico (al no disponer del tiempo suficiente para realizar estimulación ovárica controlada), ni tampoco a pacientes prepuberales.

1.4.4 Criopreservación de ovocitos

Esta técnica es a día de hoy una de las más usada en preservación de la fertilidad y, desde 2013 se considerada una técnica estandarizada para la PF por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva [93] así como por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología [94].

Tiene la ventaja (frente a la preservación de embriones) de que no es necesario tener pareja ni usar semen de donante, evitando así ciertos problemas morales y legales.

Se pueden criopreservar ovocitos inmaduros o maduros;

- Los ovocitos inmaduros, son aquellos que permanecen en fase de diploteno de la profase I de la meiosis (denominada vesícula germinal). Gracias a su menor tamaño y a su menor tasa metabólica son menos susceptibles al daño por congelación. La presencia de una membrana nuclear protegiendo la cromatina y la ausencia de huso meiótico garantiza la ausencia de anomalías citogenéticas durante las divisiones celulares sucesivas [95].

Otra ventaja de la criopreservación de ovocitos inmaduros sería que no requiere de estimulación ovárica y por tanto eliminaríamos los costes de los tratamientos farmacológicos y de la monitorización de las pacientes [96]. No obstante, aunque existen estas teóricas ventajas sobre la criopreservación de ovocitos en estadios inmaduros actualmente existen dificultades para conseguir una maduración in vitro coordinada del núcleo y del citoplasma [97, 98]. Se ha observado que tras la maduración in vitro de los ovocitos se encuentran anomalías en el huso y una condensación parcial de los cromosomas [99]. Mientras que en la maduración in vivo el ovocito se encuentra completamente desarrollado dentro del folículo y permanece detenido en etapa de vesícula germinal (profase I) hasta el pico sanguíneo de LH , los ovocitos inmaduros que son extraídos de los folículos antrales comienzan espontáneamente su maduración nuclear in vitro [100]. Dicha maduración provoca una ruptura prematura de las uniones celulares y por tanto una pérdida de metabolitos de las células del cúmulo entre los que se encuentra el ARNm, determinadas proteínas, y ciertos nutrientes y sustratos importantes para una adecuada fertilización y necesarios para el desarrollo embrionario [100]. Actualmente hay estudios que tratan de imitar los sistemas in vivo retrasando la maduración in vitro espontánea con productos químicos como quinasas, inhibidores de la fosfodiesterasa o análogos del AMPc [100-104], pero el efecto es todavía desconocido. Destacar también que hasta la fecha no se han reportado nacimientos vivos sanos a partir de la maduración in vitro de ovocitos y su posterior vitrificación en paciente candidatas a preservar su fertilidad por procesos oncológicos [96].

- En cuanto a la preservación de ovocitos maduros, (técnica muy empleada hoy en día, y que puede considerarse el gold standard) tiene el problema principal que supone someterse a la estimulación ovárica, ya que ésta no se puede realizar en pacientes prepúberes ni en aquellas que no dispongan de un tiempo mínimo y necesario antes de iniciar el tratamiento antineoplásico. Además, el número de MII (metafase II) obtenidas y vitrificadas, supone la principal clave del éxito y depende entre otros factores de la edad de la paciente, de su reserva ovárica en el momento de realizarse

el tratamiento así como del número de estimulaciones ováricas controladas realizadas [105].

El protocolo de estimulación ovárica controlada con antagonistas de la GnRH es el más frecuentemente utilizado y puede ser iniciado en fase lútea[106]. Pero aun así, se requieren de 2-3 semanas de tiempo antes de iniciar los protocolos antineoplásicos. En pacientes con tumores de mama con receptores hormonales positivos, se administra concomitantemente inhibidores de la aromatasa o moduladores selectivos de los receptores de estrógenos [107, 108]. No hay diferencias en cuanto a recurrencia de la enfermedad ni en cuanto a la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama que se realizaron una estimulación ovárica controlada, con aquellos que no se la realizaron [109]. No obstante, sería conveniente disponer de más estudios sobre la seguridad de la estimulación ovárica controlada y sobre como dicha estimulación puede afectar al propio tumor a nivel histológico y molecular.

Hoy en día la técnica más utilizada para criopreservar los ovocitos es la vitrificación mediante el sistema Cryotop® que presenta unas tasas de supervivencia tras descongelación a un 96.7% [110].

Para ello los ovocitos tras ser decumulados son transferidos a una solución de etilenglicol y medio TCM199, para posteriormente lavarlos en una solución de vitrificación en una placa de cultivo. Luego son recolectados con un volumen pequeño de solución de vitrificación (<0.1 µl) y transferidos a una fina tira de propileno para posteriormente sumergirlos en nitrógeno líquido [89, 111].

En resumen, la vitrificación de ovocitos es la técnica de elección cuando disponemos de suficiente tiempo para realizar la estimulación ovárica controlada [112] si la paciente ya ha presentado la menarquia.

1.4.5 Criopreservación de corteza ovárica

La criopreservación de corteza ovárica (CO) y su posterior trasplante (TCO), es a día de hoy todavía considerada una técnica experimental [93, 113], sobretodo debido al teórico riesgo de reintroducción de células malignas [114], a la falta de pruebas de su eficacia, y a la carencia de protocolos estandarizados. No obstante, actualmente gracias a ella se han producido más de 130 recién nacidos vivos [115], y disponemos de numerosos estudios sobre su éxito [116-121].

De hecho, un reciente estudio que compara la vitrificación de ovocitos VS TCO, muestra cómo aunque la tendencia de RNV (recién nacido vivo) es mayor tras vitrificar ovocitos que tras TCO, el TCO es un método que permite la gestación espontánea así como la restauración de la función ovárica, por lo que debería ser considerado como un método muy eficaz [122].

Debido a su importancia en la presente tesis, puesto que se trata del tema principal, viene desarrollado con detalle en el apartado 1.5.

1. 5. Criopreservación de corteza ovárica

A día de hoy podemos considerar la criopreservación de corteza ovárica y posteriormente el TCO como la primera opción cuando no disponemos de tiempo suficiente para completar un ciclo de estimulación ovárica, es decir, cuando las pacientes necesitan iniciar con inmediatez un tratamiento gonadotóxico. También se consideraría primera opción en paciente prepúberes [122].

La criopreservación de CO se puede realizar sin estimulación ovárica y por tanto sin demora, ya que los folículos primordiales que contienen ovocitos inmaduros en su interior pueden ser criopreservados directamente gracias a su actividad metabólica disminuida y a su pequeño tamaño. Las primeras tasas de supervivencia de CO se observaron en 2009 en modelos animales [123].

Para poder obtener la CO, se debe realizar una cirugía laparoscópica (en raras ocasiones la cirugía es mediante laparotomía). Una vez en la cavidad abdominal se puede realizar la extracción de CO mediante diferentes técnicas (y siempre utilizando preferentemente tijera fría para no quemar el parénquima ovárico con instrumentos eléctricos);

- Biopsia amplia
- Hemiooforectomía
- Ooforectomía
- Decorticación

Se debe ser cuidadosos en cuanto a la hemostasia se refiere y la CO puede ser extraída de la cavidad abdominal mediante una bolsa de recolección.

La cirugía se realiza generalmente con anestesia general y se puede realizar de manera ambulatoria, es decir, sin necesidad de ingreso hospitalario por parte de la paciente.

Recordar que el TCO puede permitir restaurar la función ovárica, recuperar la fertilidad natural, y disponer de un número ilimitado de ciclos de estimulación ovárica para técnicas de reproducción asistida, así como recuperar los ciclos menstruales, siempre que el injerto esté activo y funcione. Todo ello contribuye a proporcionar una mayor calidad de vida.

1.5.1 Mecanismos de crioprotección.

Existen dos posibilidades para la criopreservación de tejido ovárico: la congelación lenta y la vitrificación del tejido ovárico[124]. Destacar que con la congelación lenta los estudios de viabilidad muestran una pérdida del 50% de los ovocitos, mientras que dicha pérdida no se observa con la vitrificación [125-127]. Pero aun así los resultados obtenidos a día de hoy no son superiores con la vitrificación de tejido ovárico que con la congelación lenta[128].

1.5.1.1. Congelación lenta.

Es el método más utilizado en los programas europeos de preservación de la fertilidad [129-132]. No obstante, se trata de una técnica compleja, que requiere de un tiempo considerable y de equipos costosos para poder realizar el proceso. Es por ello que dicha técnica no se puede realizar en todos los laboratorios.

Para realizar dicha técnica se transfiere la corteza ovárica a unos crioviales que contienen un medio suplementado con SSS y DMSO (10-12.5%) (Sigma, Londres, UK), y se mantienen durante 15 minutos.

Posteriormente se transfieren los criotubos a una cámara de congelación y se aplica el siguiente protocolo de congelación lenta: a 1°C/min hasta -8°C, y a 5°C/min hasta -10°C. Luego a 2,5°C/min hasta -15°C, para mantener a -15°C durante 9 min. A continuación a 0,5°C/min hasta -35°C, a 5°C/min hasta -60°C y por último a 10°C/min hasta -120°C [133].

1.5.1.2. Vitrificación

Se trata de un método menos complejo, ya que suele ser más rápido, no requiere de equipos especiales, presenta un protocolo más sencillo y puede realizarse incluso en el propio quirófano tras la recolección de la CO. No obstante, los resultados disponibles son dispares [125, 126, 134, 135] aunque ya hay descritos nacimientos tras esta técnica [136].

Para la vitrificación de la CO, las muestras se equilibran primero con una solución de 7.5% de etilenglicol (EG) y 7.5% DSMO con medio de cultivo M199 tamponado HEPES y suplementado con 20% suero sintético sustituido (SSS) durante 25 minutos. Seguidamente se equilibran de nuevo con 20% de EG y 20% de DSMO con 0.5 M sacarosa durante 15 minutos. A continuación, los fragmentos se introducen en una solución con mínimo volumen en una fina tira de metal (Kitazato BioPharma, Fujinomiya, Japan) y son sumergidos directamente en nitrógeno líquido estéril. Para finalizar las muestras se

colocan en un tanque de almacenamiento de nitrógeno en fase vapor [124, 126, 137].

1.5.2 Retrasplante.

Actualmente, el retrasplante supone un punto crítico en cuanto al éxito de la técnica de criopreservación ovárica, ya que la lesión isquémica del tejido trasplantado produce la pérdida de prácticamente toda la población de folículos en crecimiento, así como la pérdida una parte importante de los folículos primordiales [138].

Es decir, uno de los factores más limitantes para la supervivencia de los folículos primordiales de la corteza trasplantada es el tiempo de revascularización. Para ello se han investigado el papel de diferentes agentes angiogénicos como el VEGF 111 (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) [139] en la revascularización del tejido. También encontramos estudios con determinados fármacos como el Setarud (IMOD™) que parece estimulan la angiogénesis en el tejido ovárico trasplantado [140].

Otros estudios apuntan hacia el retrasplante de corteza junto con células endoteliales y estromales porque parece podría facilitar la formación de un estroma ovárico más estructurado y mejor vascularizado [141].

1.5.3 Mecanismos de separación médula-corteza.

El grosor de la corteza tras separarla de la médula es importante tanto a la hora de criopreservar el tejido como a la hora del retrasplante. Un grosor excesivamente fino de la corteza (entre 0,5-0,9mm) aunque se podría pensar que facilita la penetración de los crioprotectores y que facilitaría la revascularización en el trasplante, se ha relacionado con una mayor pérdida folicular ya que facilita la activación folicular y su agotamiento[49].

En la actualidad, existen diversos mecanismos para separar la médula ovárica de la corteza:

- Separación de la médula de la corteza realizando un raspado con hoja de bisturí.
- Separación de la médula de la corteza cortando con microtijera quirúrgica.
- Separación de la médula de la corteza mediante slicer.

No obstante, hasta la fecha ninguno de los grupos de trabajo en este ámbito ha evaluado los efectos de dicha separación corteza-médula sobre la viabilidad del tejido.

Debido a que se trata del primer procedimiento al que se somete el tejido tras su extracción, y es además el objetivo del presente estudio, será detalladamente analizado en material y métodos

2. Hipótesis

Actualmente existen numerosas publicaciones describiendo diferentes protocolos de criopreservación de tejido ovárico sin existir un consenso sobre cómo preparar el mismo desde que se extrae el tejido hasta que se preserva.

Ciertos equipos separan la médula de la cortical mediante rascado con un bisturí frío; existen protocolos de separación de la médula-corteza con microtijera quirúrgica bajo lupa o microscopio; y también, se han desarrollado instrumentos específicos (como el slicer) para separación de la corteza. Hasta la fecha no hay ningún estudio que valore la repercusión del método de separado de corteza en los resultados de la viabilidad folicular post-criopreservación.

Parece razonable pensar que las distintas formas de separación de la médula de la corteza pueden tener repercusiones sobre la viabilidad folicular, puesto que se trata del primer paso en el proceso de la criopreservación ovárica, y por tanto podría resultar un paso limitante.

3. Objetivos

3.1. Objetivo principal:

Valorar el efecto de las distintas técnicas de separación de la médula sobre la corteza para evaluar y analizar diferencias a nivel de la viabilidad folicular y estromal, con el fin de poder identificar la técnica menos lesiva.

3.1 Objetivos secundarios:

- Evaluar la viabilidad de la corteza ovárica en función de la técnica de separación médula-corteza empleada.
- Evaluar el estrés mecánico en función de la técnica de separación médula-corteza empleada.
- Evaluar la inflamación función de la técnica de separación médula-corteza empleada.
- Evaluar la vascularización y la proliferación celular en las muestras tras el xenotrasplante en función de los diferentes métodos de separación médula-corteza, y en comparación con las diferentes técnicas de criopreservación.

4. Material y métodos

4.1 Diseño del estudio y técnicas de decorticación

Se realizó un estudio experimental para evaluar el efecto que producirían las diferentes técnicas de decorticación ovárica. Para ello, estudiamos tanto in vivo como in vitro las diferentes técnicas, así como su combinación con dos métodos diferentes de criopreservación ovárica.

Las técnicas de decorticación seleccionadas para estudio fueron las siguientes:

- Raspado con hoja de bisturí No 22A (Swaann Morton, Sheffield, UK), correspondiente a grupo experimental B.
- Cortando con microtijera quirúrgica (SCD-10, S&T, Neuhausen, Switzerland), correspondiente al grupo M.
- Separación mediante slicer (Kitazato, Biopharma, Fujinomiya, Japan), correspondiente al grupo S.

Iniciamos el estudio con la parte in vitro, donde tras la decorticación con las técnicas anteriormente descritas y el cultivo de los fragmentos ováricos, medimos la densidad folicular y la viabilidad mediante la cuantificación de la Caspasa 3 activada y TUNEL (marcado final de corte de terminal deoxinucleotidil transferasa, del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling*). También valoramos la inflamación mediante la secreción de TNF- α (factor de necrosis tumoral α) en el medio de cultivo, así como el estrés mecánico producido mediante la expresión relativa de HSP 60. También valoramos la de los genes de la ruta Hippo. Comparamos además los resultados con las muestras del grupo control.

Para la parte correspondiente al estudio in vivo, comparamos la combinación de los 3 métodos anteriormente descritos con dos técnicas diferentes de criopreservación: congelación lenta (SF) y vitrificación (VT).

Posteriormente dichas muestras fueron xenotrasplantadas en ratones inmunodeficientes (Nude Mice) para evaluar la densidad folicular y la función endocrina de cada fragmento. Por último, también evaluamos la vascularización y la proliferación celular en las muestras obtenidas tras el xenotrasplante (figura 17).

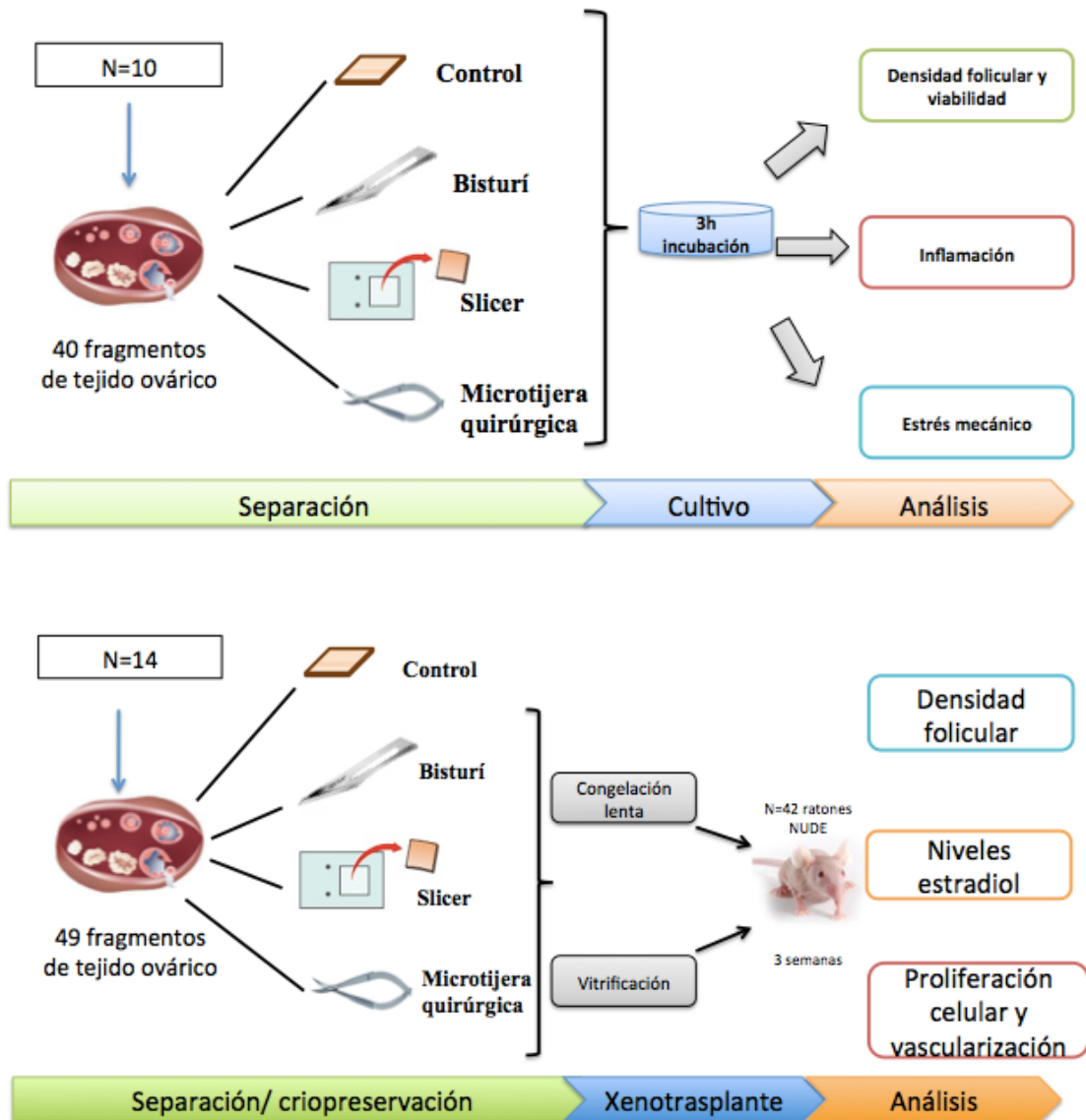


Figura 17. Resumen del diseño del estudio.

4.1.1. Muestras de tejido ovárico humano

El uso de muestras de tejido ovárico humano fue aprobado por el comité ético del hospital Universitari i Politècnic La Fe (2013/0377) y todas las

pacientes fueron debidamente informadas y aceptaron el consentimiento informado.

Para el estudio in vitro, obtuvimos 10 biopsias ováricas de pacientes que fueron sometidas a ooforectomía unilateral para criopreservación de corteza ovárica previo tratamiento gonadotóxico. La media de edad de las pacientes fue de 28.6 años con un rango de entre 15 y 34. La patología más frecuente fue el cáncer de mama (en 8 pacientes), seguido del Linfoma de Hodgkin en una paciente, y un sarcoma de Edwing en otra paciente (tabla 6).

Nº Muestra	Edad	Diagnóstico
1	35	Neoplasia de mama
2	25	Neoplasia de mama
3	37	Neoplasia de mama
4	15	Linfoma de Hodgking
5	19	Sarcoma de Edwing
6	22	Neoplasia de mama
7	31	Neoplasia de mama
8	30	Neoplasia de mama
9	34	Neoplasia de mama
10	34	Neoplasia de mama

Tabla 6. Resumen de muestras sometidas a estudio in vitro.

Con respecto al estudio in vivo, se recogieron 14 biopsias de tejido ovárico procedentes de 14 mujeres sometidas a cirugía LPS (laparoscópica) por procedimientos benignos. El rango de edades estaba comprendido entre 21-

41 años, siendo la media de edad de 35.8. El procedimiento más frecuente fue la quistectomía LPS de ovario contralateral (en 6 pacientes), seguido de la salpinguectomía bilateral (en 5 pacientes) y por último la miomectomía (en 3 pacientes), (tabla 7):

Nº muestra	Edad	Diagnostico
A	36	Teratoma ovárico anterior
B	41	Útero polimiomatoso
C	38	Quiste en ovario izquierdo
D	37	Esterilización tubárica
E	39	Teratoma ovárico, anexectomía izquierda
F	32	Esterilización tubárica
G	41	Ooforectomía BRCA 1+
H	40	Esterilización tubárica
I	33	Esterilización tubárica en cesárea
J	21	Quistectomía derecha
K	41	Ooforectomía + quistectomía
L	28	Miomectomía
M	34	Preservación de la fertilidad (neo mama)
N	40	Quistectomía

Tabla 7. Resumen de muestras sometidas a estudio in vivo.

4.2. Estudio in vitro.

4.2.1. Incubación de corteza ovárica

Tras la obtención de las muestras de tejido ovárico, cada una de las biopsias (N=10), fue dividida en 4 fragmentos de aproximadamente 0.5x0.5cm. Dichos fragmentos fueron aleatoriamente asignados a uno de los 4 grupos experimentales anteriormente descritos para cada una de las técnicas de decorticación (C, B, M o S).

A continuación, para permitir la activación de las rutas de apoptosis, tras la decorticación, cada fragmento fue incubado en una placa de 6 pocillos (Kitazato, Fujinomiya, Japan) con 0.5ml de medio de cultivo HEPES-buffered M199 (sigma Aldrich, St. Louis, USA) durante 3 horas a 37° y 5% de CO₂.

Tras la incubación, cada muestra de ovario fue dividida en dos fragmentos. Uno de los fragmentos se fijó en formalina al 10% y posteriormente fue incluido en parafina. El otro de los dos fragmentos fue guardado a -80°C hasta su posterior análisis por qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa). El medio de cultivo fue recogido y congelado a -80°C.

4.2.2. Evaluación histológica y de la densidad folicular.

Para la evaluación histopatológica de las muestras, éstas fueron previamente sometidas a un protocolo estándar de fijación, lavado, aclaramiento, inclusión, corte, tinción y montaje.

Para la fijación se utilizó formalina 10% (Panreac, Barcelona, España) ya que inactiva determinadas enzimas y evita la autólisis. Para eliminar el exceso de fijador, se deshidrataron las muestras con alcohol de graduación creciente (50, 70, 80, 90%) para finalmente sumergirlas en alcohol absoluto (Panreac, Barcelona, España). A continuación, se aclararon las muestras con xilol (Panreac, Barcelona, España) y se incluyeron en un medio de soporte que permitiera obtener cortes con el microtomo. Para ello se incluyeron en recipientes de parafina fundida a 60^a, que se dejaron 1 hora en la estufa a 60^a

para que se evaporase el xilol. Este paso se repitió otra vez, para que se evaporase una mayor cantidad de xilol y los espacios ocupados por éste, fueran ocupados por parafina.

A continuación, las muestras se incluyeron en un molde de metal y se dejaron a temperatura ambiente para su solidificación. Posteriormente se obtuvieron cortes de 4- μ m utilizando el microtomo (Microm GMBH, tipe HM310, Walldorf, Alemania) y se recogieron con portaobjetos SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Por último, para mejorar su adhesión y secado, se colocaron en una estufa a 37°C durante 48-72 horas. Para el recuento folicular se tiñeron 1 de cada 10 secciones con Hematoxilina- eosina; Hematoxilina de Harris (Sigma, St Louis, Estados Unidos) durante 15 minutos, se lavaron con agua durante 5 minutos y se añadió eosina alcohólica (Sigma, St Louis, Estados Unidos) durante 5 minutos más. Para teñir las muestras fue necesario desparafinarlas en una estufa a 60° durante 1 hora y colocarlas después en xilol. Dicho paso se tuvo que repetir 4 veces para asegurar una correcta eliminación de la parafina. A continuación, se rehidrataron las muestras con concentraciones de alcohol de manera decreciente: 90, 80, 70, 50%, y posteriormente con agua destilada, para después proceder a la tinción. Tras la tinción, las muestras se deshidrataron con alcohol de manera creciente (50, 70, 80, 90%) para luego añadir xilol y dejarlas allí durante 6 minutos. Luego las muestras se montaron en un cubreobjetos con una base de pegamento (Eukitt, Kinder GmbH & Co, Freiburg, Alemania) y se guardaron a temperatura ambiente.

La clasificación de los folículos en las muestras teñidas con H&E, fue la siguiente[12] (figura 18):

- Foliculo primordial: el ovocito se encuentra rodeado por una capa aplanada de células de la granulosa (CG).
- Foliculo primario: el ovocito se encuentra rodeado de una capa cúbica de CG.
- Foliculo secundario: el ovocito se encuentra cubierto por dos o tres capas cúbicas de CG.

- Folículo terciario: el ovocito se encuentra cubierto por 4 o más capas de CG, el antro no es visible.
- Folículo antral temprano: la cavidad antral comienza a formarse. Generalmente rodeado de 4 o más capas de CG.
- Folículo antral: el folículo contiene un espacio antral bien definido.
- Folículo pre-ovulatorio: folículo antral de mayor tamaño donde el ovocito es rodeado por células del cúmulo formando el complejo-cumulo-ovocito.

Además, para evitar que un folículo fuera contando dos veces, solo se contabilizaban los folículos que tuvieran el núcleo presente.

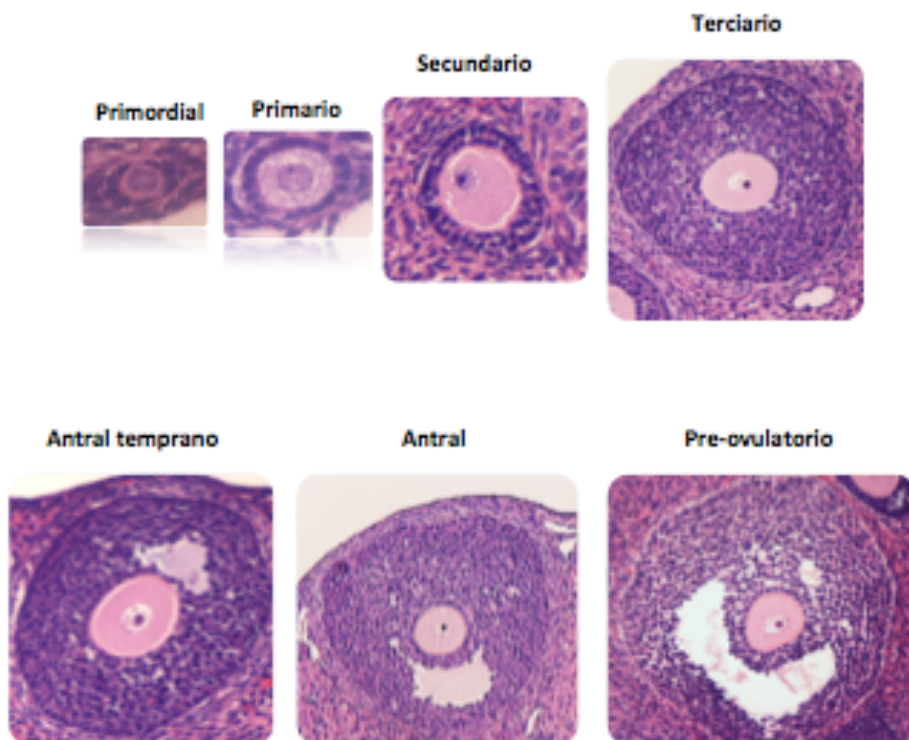


Figura 18. Descripción del conteo folicular.

Únicamente se contaron los folículos morfológicamente normales [142] para establecer el porcentaje y la densidad de folículos quiescentes (primordiales) y los folículos en crecimiento (primarios y secundarios). Todas las secciones teñidas con H&E fueron examinadas por dos observadores diferentes (SL y SM).

4.2.3 Análisis de la viabilidad folicular: TUNEL mediante inmunofluorescencia.

La viabilidad folicular fue analizada mediante TUNEL. Dicha técnica permite detectar la fragmentación del ADN producida por la activación de las cascadas de apoptosis. Como consecuencia de la fragmentación del ADN se generan extremos 3' a los que la enzima TdT (desoxinucleotidil-transferasa terminal) es capaz de añadir dUTPs (2'-desoxiuridina 5'-trifosfato) marcados. Para ello se utilizó el kit *TMR red In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Es decir, tras desparafinar e hidratar las muestras (como se ha explicado con detalle anteriormente), se realizó un desenmascaramiento antigénico utilizando una solución de 10mM de citrato de sodio con pH de 6. Luego se incubó durante 5 minutos a 850W en microondas. Posteriormente los cortes se incubaron durante 60 minutos a 37° en cámara húmeda y en oscuridad con la mezcla TUNEL, a su vez compuesta por dUTPs marcados con fluoróforo TMR (tetrametil rodamina), y una solución enzimática (TdT). Durante la incubación la TdT añade moléculas de TMR-dUTP a los extremos 3' que se han generado debido a la fragmentación del ADN en las células apoptóticas. Para finalizar se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino (PBS; VWR International Eurolab, S.L., Barcelona, España) y se produjo el montaje de las muestras con el medio 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) *ProLong Gold antifadereagent* (Life Technologies, Carlsbad, CA), dejándose a TA (temperatura ambiente).

Se incluyó tanto un control positivo como un control negativo del marcaje. Para el control positivo utilizamos una sección de fragmento ovárico incubado tras el desenmascaramiento antigénico durante 10 minutos con 2000 U/mL de DNasa I en 50mM Tris + 1mg/mL de BSA con pH 7,5. Para el control negativo se utilizó una sección de fragmento ovárico sometido solo a la solución de marcaje y sin solución enzimática.

Se analizaron cuatro secciones representativas de cada fragmento, realizando de cada una de las muestras cuatro imágenes a 20x con microscopio de fluorescencia Leica EL6000 (Leica Microsystems GmbH, Alemania) acoplado a la cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania). A continuación, se procedió a cuantificar la señal TUNEL positiva (roja) y DAPI positiva (azul) gracias al programa *Image Pro-plus* (Mediacybernetics, Carlsbad, CA, USA). Además, se calculó el porcentaje de células apoptóticas como el área TUNEL positiva respecto al área DAPI. Para terminar, señalar que se analizaron tanto el núcleo del ovocito como los núcleos de las células de la granulosa que lo rodean. Así pues, realizamos una clasificación (figura 19) según el porcentaje de células de la granulosa marcadas con TUNEL positivo y según si el núcleo también se encontraba marcado con TUNEL o no.

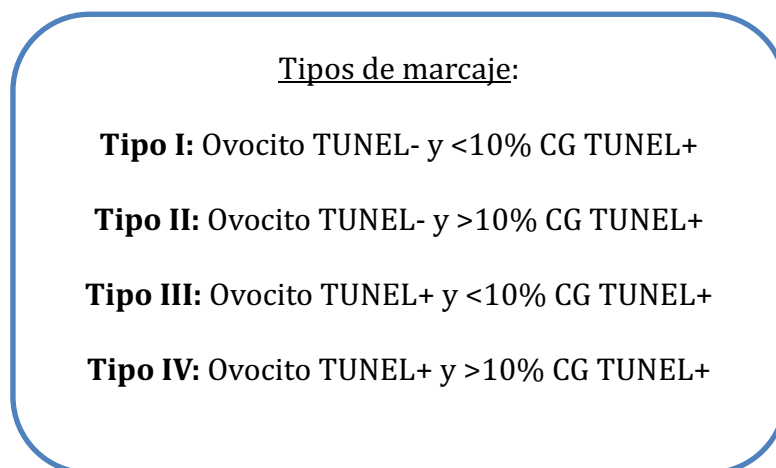


Figura 19: Tipos de marcaje de ovocitos según TUNEL.

4.2.4 Cuantificación de TNF α en medio de cultivo mediante ELISA.

Para la determinación de TNF α , las muestras de medio de cultivo se analizaron con un *TNF α Human Biotrak Easy Elisa* (GE, Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK). Las muestras fueron conservadas a -80 $^{\circ}$ hasta su uso para evitar la pérdida de TNF α bioactivo. Para la determinación, todas las muestras, (estándar, blancos y controles), se analizaron por duplicado. Se utilizaron 400 μ l de tampón de lavado cuyo pH fue 7.4.

Antes de cargar la placa, se descubrieron los pocillos cuidadosamente para no dañar los pellets liofilizados. Se añadieron 150 μ l de agua destilada tanto a los pocillos estándar como a los blancos. Luego se añadieron 100 μ l de agua destilada a las muestras, y se añadió 50 μ l de la muestra a los pocillos designados. Se cubrió la placa y se incubó a TA durante 3 horas en un agitador a 200 rpm. Después se lavaron los pocillos 6 veces con aproximadamente 400 μ l de tampón de lavado, volviendo a poner especial cuidado en no dañar la superficie de los pocillos. Tras ello se vacían y se colocan las tiras de los micropocillos en una almohadilla absorbente para eliminar el exceso de tampón de lavado. A continuación se pipetearon 100 μ l de sustrato TMB (Tetrametilbencidina) en todos los pocillos y se incubó durante 15 minutos a TA en un agitador de microplacas a 200rpm (revoluciones por minuto), evitando la exposición directa a la luz. Para detener la reacción enzimática, se colocaron 100 μ l de solución de parada, de manera rápida. Los resultados se leyeron inmediatamente. La reacción colorimétrica fue medida a 450nm con Spectra Max PLUS 384 (Molecular devices, Sunnyvale, California). Todas las muestras se analizan por duplicado. El límite de detección (LOD) fue 2.6 pg/ml, la variación interensayo fue de 9.3% y la variación intraensayo fue de 6%.

4.2.5. Expresión génica del gen HSP 60, ruta Hippo y de Caspasa 3 mediante q-PCR.

Los efectos del estrés mecánico, la apoptosis y la ruta Hippo se examinaron mediante la expresión de HSPD1, CASP3, BIRC1, BIRC7, CCN2 y YAP1 respectivamente.

4.2.5.1. Extracción y retrotranscripción de ARN de muestras en fresco.

Para la extracción de ARNm de tejido en fresco, éste se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, California, Estados Unidos) siguiendo también las instrucciones del fabricante. Después de poner 500 μ l de Trizol y con la ayuda de un bisturí estéril, tras disgregar el tejido, se añadió 100 μ l de cloroformo (Sigma, St Louis, Estados Unidos). Tras una centrifugación a

13.000 rpm durante 15 min y a 4°C, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le añadieron 250 µl de isopropanol (Sigma, St Louis, Estados Unidos). Después de una incubación durante 10 min a TA, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 75% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) filtrada y centrifugado a 7.500 rpm. durante 5 min. Por último, después de secarse los “pellets” de ARN se resuspendieron en 12 µl de agua estéril libre de nucleasas.

Una vez obtenido el ARN, procedimos a su análisis tanto en cantidad como en integridad mediante métodos espectrofotométricos (NanodropTM, Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Dicho equipo mide la absorbancia de todas las moléculas de la muestra (ARN, nucleótidos, ADN monocatenario, y ADN de doble cadena) que absorben a la longitud de onda de interés. Todas ellas absorben a 260 nm y por tanto, contribuirán a la absorbancia total de la muestra.

Se utilizó el ratio de absorbancia de 260/280 nm para medir la pureza del ARN y del ADN. Podemos considerar pura la muestra si presenta una ratio próxima a 1,8 si se trata de ADN y de 2,0 si se trata de ARN. Si la ratio es menor puede ser un indicador de la posible presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben cerca de la longitud de onda de 280 nm.

Por su parte, la retrotranscripción de ARN de dichas muestras se llevó a cabo mediante el kit *Advantage RT-for-PCR* (Clontech, Palo Alto, California, Estados Unidos). En cada muestra se añadió entre 0,2-1 µg de ARN en un tubo estéril de 0,2 ml y 1 µl de oligo (dT) a 20 µM (oligonucleótidos de unión aleatoria a la cadena de ARNm que sirven como molde para la enzima retrotranscriptasa). Se incubaron durante 5 min a 72°C y posteriormente se añadió una mezcla de: 4 µl 5x reacción tamponada, 1 µl desoxiNTP (desoxinucleótidos) (10 mM), 0,5 µl de inhibidor recombinante de la ribonucleasa (40 U/µl) y 1 µl (200 U/µl) de la transcriptasa inversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV) (“Moloney Murine Leukemia Virus” en inglés). Después de mezclar todos los componentes, las muestras se

incubaron 1 hora a 40°C, seguido de una segunda incubación a 72°C durante 10 minutos para paralizar la síntesis de ADNc y detener la actividad de la desoxirribonucleasa. Posteriormente la cantidad de ADNc se cuantificó mediante métodos espectrofotométricos. Con agua libre de ARN se diluyó la muestra a una concentración final de 100 ng/μl y se almacenó a -20°C hasta la realización de la RT-qPCR.

4.2.5.2. *Extracción y retrotranscripción de ARN en muestras en parafina.*

Para la extracción de ARN de muestra de parafina, utilizamos el *kit Recover allTM total nucleic acid isolation kit for FFPE* (“Formalin Fixed Paraffin-Embedded”) (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) utilizando las instrucciones de la casa comercial.

Se realizaron 3-4 cortes de 20 μm de cada muestra, se introdujeron en un tubo estéril (libre de ARNsas) y se añadió 1 ml de xilol (Panreac, Barcelona, España) para incubarlo mientras se agitaban durante 3 min a 50°C. Seguidamente, se centrifugaron durante 3 min a 13.400 rpm y se eliminó el sobrenadante. Para asegurarnos la correcta eliminación de cualquier resto de parafina, este paso se repitió. A continuación, se realizaron dos lavados más con 1 ml de etanol absoluto y se centrifugaron de nuevo a 13.400 rpm durante 3 min. Además, para la eliminación absoluta del etanol, los tubos se dejaron en una estufa a 37°C durante 30 min con la tapa abierta. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 μl de “Digestion Buffer” y 4 μl de proteasa. Dicha mezcla se incubó durante 15 min a 50°C en un agitador. Después se incubaron otros 15 min a 80°C. A cada uno de los tubos se le añadió 240 μl de “Isolation Aditive” y 550 μl de etanol (a -20°C) y se centrifugaron en una columna durante 1 min a 10.000 rpm a TA. Luego se añadieron 700 μl de “Wash Buffer 1” y se centrifugó de nuevo durante 1 min a 10.000 rpm. Una vez eliminado el líquido, se añadieron 500 μl de “Wash Buffer 2/3” repitiéndose la centrifugación. Con una nueva centrifugación rápida de 30 segundos se secó el filtro que contenía el ARN. A continuación, se preparó una mezcla de “10X DNase Buffer”, “DNase” y el agua libre de

nucleasas. Esta mezcla fue depositada en el filtro de la columna incubándose durante 30 min a TA. Después de este tiempo, se añadieron 700 µl de “Wash Buffer 1” y se centrifugó durante 1 min a 10.000 r.p.m. Posteriormente se añadió 500 µl de “Wash Buffer 2/3” y se repitió la centrifugación. Se añadieron 35 µl de agua libre de ARN en el centro del filtro incubándose 10 min a TA. Tras esto, se añadieron otros 35 µl de agua, se incubó 5 min y se centrifugó durante 3 min a 10.000 rpm. Finalmente, a cada muestra se le añadieron 20 U de *Rnase Inhibitor* (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) para evitar la degradación del ARN. Las concentraciones de ARN de cada muestra fueron medidas mediante métodos espectrofotométricos (apartado 2.2) y las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

La retrotranscripción de ARN obtenido de muestras en parafina se realizó con el kit *HIGH Capacity cDNA RT* (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron 500 ng de ARN de cada muestra ajustando a un volumen final de 25 µl con agua libre de nucleasas. Con una mezcla de cebadores aleatorios y una enzima retrotranscriptasa (MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50U/µl) se llevó a cabo la síntesis de ADNc. Esta mezcla estaba compuesta de: 5 µl de 10X RT, 2 µl de dNTPs, 5 µl 10X cebadores aleatorios, 2,5 µl de inhibidor de ARNasa, 2,5 µl de retrotranscriptasa y 8 µl de agua libre de ARN. La retrotranscripción se realizó en un termociclador (T3000 Biometra, Göttingen, Alemania) con el siguiente protocolo: 25°C durante 10 min, 37°C durante 120 min, y 85°C durante 5 min. Se cuantificó el producto mediante espectrofotometría, como se ha descrito con anterioridad. La muestra se diluyó con agua libre de nucleasas a una concentración final de 100 ng/µl y se almacenó a -20°C hasta la realización de la RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa).

4.2.5.3. RT qPCR

Antes de explicar la metodología de la RT-qPCR, debemos saber que a

diferencia de la PCR competitiva, ésta permite la automatización y además de ser más rápida, no necesita el procesamiento posterior del producto de PCR, por lo que se reduce el riesgo de contaminación.

La RT-qPCR es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARNm de una muestra. Gracias a ella podemos determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN utilizando cebadores específicos de secuencia. Si la PCR a tiempo real se combina con una reacción previa de retro-transcripción, se puede determinarse la cantidad de ARNm de una muestra mediante una cuantificación relativa. Se denomina cuantificación relativa porque se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo (control endógeno). Para normalizar la expresión utilizamos como control endógeno ARNr 18S

Para cuantificar el producto, necesitamos añadir fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, y por tanto, a mayor producto se emite mayor fluorescencia. Además, la cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, por tanto, aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

El principal método de análisis de RT-qPCR (y el que utilizamos en nuestro experimento) es el que emplea sondas TaqMan [143]. Dicho método garantiza la obtención de ensayos de PCR altamente específicos, con una eficiencia de amplificación cercana al 100% y permite además evaluar numéricamente la cantidad de moléculas de material genético presente en cada muestra.

Dicha metodología está basada en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa y en la amplificación mediante RT-qPCR de una secuencia diana determinada, en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan) que hibrida con la secuencia diana que estamos amplificando.

Además, se encuentra unido un fluorocromo en posición 5' y un

amortiguador de fluorescencia en posición 3' que se une al surco menor del ADN en la sonda TaqMan. Esto la protege de la actividad exonucleasa de la enzima Taq polimerasa (figura 20).

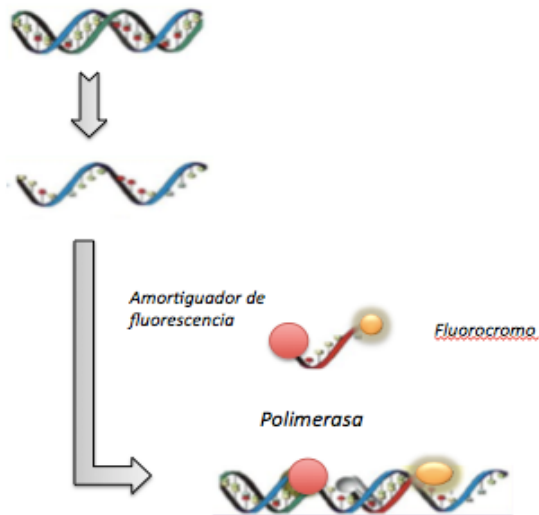


Figura 20. Mecanismo de acción del amortiguador de fluorescencia. RT-qPCR con sonda TaqMan.

La sonda TaqMan se situará entre los dos cebadores y se hibridará específicamente con la secuencia diana (si está presente en la muestra). Si se produce la etapa de extensión en la reacción de PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa degradará la sonda TaqMan lo que liberará al fluorocromo, que al estar fuera de la influencia del amortiguador podrá producir una señal que podrá ser captada por el sistema óptico del equipo. Dicho proceso no interfiere con la acumulación del producto de la RT-qPCR. y por ello, se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de la reacción (figura 21).

Otro beneficio de la enzima Taq polimerasa es que no digiere la sonda libre, sino únicamente la hibridada, por lo que la cantidad de producto acumulado es proporcional a la señal fluorescente emitida. Además, la medición de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma continua, por lo que disponemos de una información dinámica en tiempo real del proceso. Gracias a ello, podemos establecer el ciclo umbral (Ct) (en inglés "Cycle Threshold"),

esto es, que podemos establecer el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto producido alcance el nivel de detección que hemos fijado, y que a su vez está directamente correlacionado con la cantidad de ADNc de la secuencia diana.

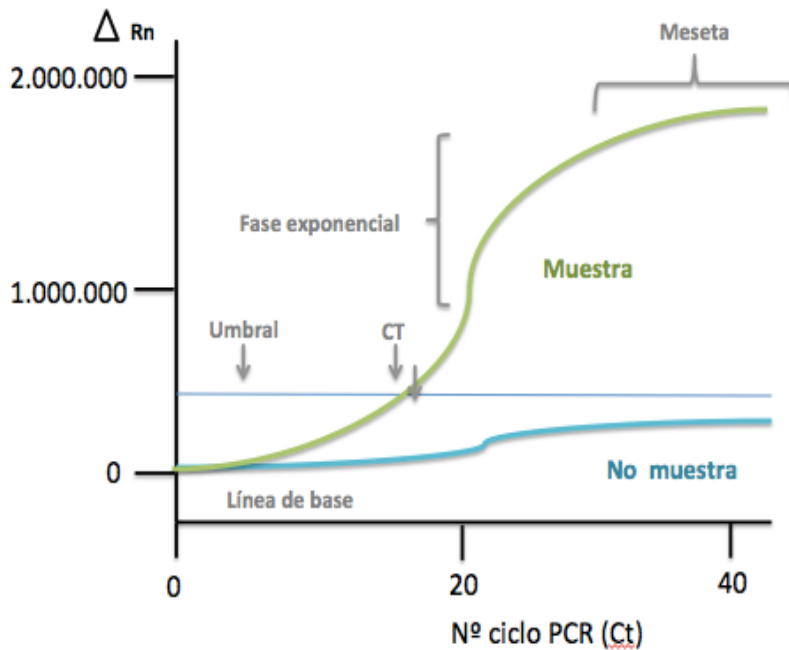


Figura 21. Modelo de RT-qPCR. Se observa el nº de ciclo de la PCR (Ct) respecto al producto de PCR (ΔRn) de una muestra y del control negativo [144].

Para calcular la expresión relativa de un gen utilizamos el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [145] que consiste en relativizar la expresión del gen en la muestra problema con respecto a la muestra control, y normalizar ambas con la expresión de un gen constitutivo.

Brevemente:

- Cálculo del valor de ΔCt : se realiza para normalizar el valor de Ct de cada muestra respecto al control endógeno:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{control endógeno}}$$

- Cálculo de $\Delta\Delta Ct$: Normaliza respecto a la muestra control o calibrador:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ muestra control}$$

- Cálculo de la expresión relativa ("Fold change"): Refleja cuántas veces se expresa el gen problema en la muestra bajo estudio respecto a la muestra control, relativizado a la expresión basal de un gen constitutivo. Así, la muestra control tendrá un valor de 1, mientras que las muestras problema presentarán un valor mayor (si la expresión del gen es mayor) o menor de 1 (si la expresión del gen es menor).

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Gracias a todas las características, la metodología de la TaqMan RT-qPCR se utilizó para el análisis de expresión génica de marcadores (**HSPD1**, **CASP3**, **BIRC1**, **BIRC7**, **CCN2** and **YAP1**) de las muestras pertenecientes al grupo control (sin decorticación) y de las muestras de cada uno de los grupos (S, B y M). Los experimentos de RT-qPCR se realizaron con el sistema *ABI PRISMTM 7900 Sequence Detection* (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos). Los cebadores utilizados y los correspondientes controles se detallan en la tabla 8.

Se usó FAM (carboxi-fluoresceína) como fluorocromo de unión al ADN de doble cadena, cuya absorbancia es de 535 a 495 nm. Por 10 μ l de reacción TaqMan, se mezcló 3,5 μ l de agua destilada libre de ARN, 1 μ l de ADNc, 5 μ l de "TaqMan Universal PCR Master Mix" (PE Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) y 0,5 μ l 20x "Assay on Demand" que contenían los cebadores y la sonda específica para cada gen. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. Las condiciones de RT-qPCR fueron: 2 min a 50°C y a continuación 10 min a 95°C para la activación enzimática. Luego se realizan

45 ciclos de dos pasos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Los productos finales fueron analizados con el software específico de sistema de detección de secuencias 7900HT versión 2.4 (PE Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos). Para representar los datos utilizamos el valor medio relativo del gen analizado y lo normalizamos con respecto al valor correspondiente del gen de la subunidad 18S del ARN ribosómico utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [145, 146].

Gen	Código sonda	Amplicon (pb)	Rxn	Proyecto	Especie
NAIP (BIRC1)	Hs00244967_m1	106	XS:75	Hippo pathway	Human
NAIP (BIRC1n)	Hs03037952_m1	91	S:250	Hippo pathway	Human
BIRC7	Hs01086675_m1	95	XS:75	Hippo pathway	Human
CTGF (CCN2)	Hs01026925_g1	91	XS:75	Hippo pathway	Human
YAP1	Hs00371735_m1	64	XS:75	Hippo pathway	Human
HSPD1 (Hsp60)	Hs01036747_m1	109	XS:75	Marcador estrés. Proces. CO	Human
CASP3	Hs00234387_m1	100	S:250	APOPTOSIS	Human
18S	Hs99999901_s1	187	S:250	Housekeeping	Human

Tabla 8. Datos de los cebadores utilizados

4.3. Estudio In vivo.

4.3.1. Grupos experimentales.

Tras la obtención de muestras de tejido ovárico (apartado 4.1 y 4.1.1), cada fragmento (N=14), se dividió en partes hasta obtener 49 fragmentos. A continuación, cada uno de las cuales fue asignado a uno de los siguientes

grupos experimentales de tal manera que cada grupo experimental estaba formado por 7 muestras de tejido ovárico.

- Decorticación con hoja de bisturí + congelación lenta (B+SF)
- Decorticación con microtijera quirúrgica + congelación lenta (M + SF)
- Decorticación con slicer + congelación lenta (S+ SF)
- Decorticación con hoja de bisturí + vitrificación (B+VT)
- Decorticación con microtijera quirúrgica + vitrificación (M + VT)
- Decorticación con slicer + vitrificación (S+ VT)
- Grupo control: no se realizó decorticación de corteza

Posteriormente las muestras se xenotrasplantaron en ratones NUDE (figura 22):

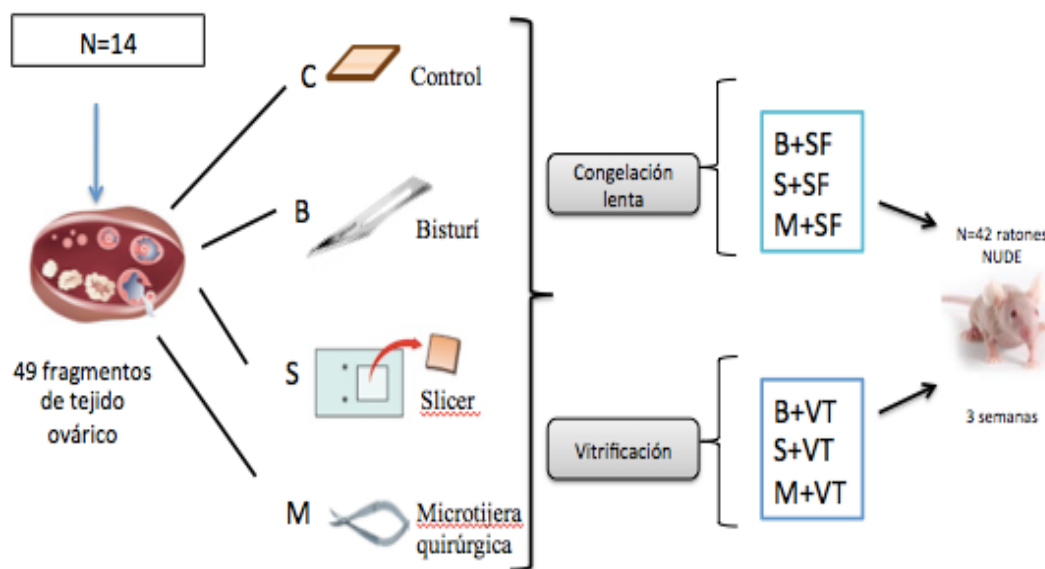


Figura 22. Esquema de los diferentes grupos experimentales en estudio in vivo.

4.3.2. Técnicas de criopreservación

4.3.2.1. Congelación lenta (SF) y descongelación

Cada pieza tras ser decorticada según la técnica correspondiente (dependiendo de la aleatorización) y asignada al procedimiento de

congelación lenta (B+SF, M+SF, S+SF), fue sometida al siguiente protocolo [124, 147]:

Se utilizó una solución crioprotectora que contenía el 5% de seroalbúmina humana (HSA) y 10% de dimetil sulfoxido sulfato (DMSO), (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) en medio de cultivo M199. El crioprotector se añadió mediante dilución secuencial, en dos pasos.

Al inicio, se colocaron los fragmentos en solución de 5% DMSO y 5% de HSA suplementado con HEPES amortiguado con medio de cultivo M199 durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió a dichas muestras 10% DMSO y 2.5% HSA suplementado con medio M199 durante 15 minutos. Ambas incubaciones se realizaron en temperaturas frías (2-10°C). Tras completar el protocolo de carga del crioprotector, las muestras fueron introducidas en cryoviales y se colocaron en un dispositivo convencional de congelación, Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Se aplicó el siguiente protocolo congelación lenta (con siete rampas de enfriamiento):

- [1] 1°C / min a 8°C;
- [2] 5°C / min a 20°C;
- [3] a 2. 5°C / min a 15°C / min;
- [4] mantener a 15°C durante 9 minutos;
- [5] a 0, 5°C / min a 35°C;
- [6] a 5°C / min a 60°C;
- [7] a 10°C / min a 120°C.

Destacar que se realizó un paso complementario de “seeding”, para evitar la formación de cristales de hielo en el tejido, de 8°C/min en el paso 2, y que finalmente, las bolsas se almacenaron en nitrógeno líquido (a -196°C).

Las muestras se descongelaron el mismo día del xenotrasplante. Para ello, se disolvió la solución de crioprotector 1:1 con solución de lavado (M199 y 5% de BSA). Tras 10 minutos a temperatura ambiente, la mitad del sobrenadante

fue eliminado y se reemplazó el mismo volumen con una solución de agua. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, el volumen sobrenadante se desechó y fue remplazado inmediatamente por solución de lavado.

4.3.2.2 *Vitrificación (VT) y desvitrificación.*

La vitrificación fue llevada a cabo usando el kit de vitrificación Cryotissue (Kitazato Biopharma, Fujinomiya, Japan), según las instrucciones del fabricante. Las muestras de ovario se equilibraron con una solución de 7.5% de etilenglicol (EG) y 7.5% DMSO con medio de cultivo M199 tamponado HEPES y suplementado con 20% suero sintético sustituido (SSS) durante 25 minutos. A continuación, se equilibró de nuevo con 20% de EG y 20% de DMSO con 0.5 M sacarosa durante 15 minutos [124, 126, 137]. Posteriormente los fragmentos fueron introducidos en una solución con mínimo volumen en una fina tira de metal (Kitazato BioPharma, Fujinomiya, Japan) y sumergidos directamente en nitrógeno líquido estéril. Por último, las muestras se colocaron en un tanque de almacenamiento de nitrógeno en fase vapor.

Las muestras vitrificadas, se desvitrificaron con el kit de desvitrificación Cryotissue (Kitazato Kitazato BioPharma, Fujinomiya, Japan). La fina tira de metal se transfirió directamente desde el nitrógeno líquido donde estaba almacenada a los tubos que contenían una solución para hacer entrar en calor la muestra, seguida del protocolo del fabricante, comprendido con 1.0 mol/L sacarosa en HEPES-tamponado TCM-199 con 20% SSS a 37°C durante 1 minuto, seguido de una solución de sacarosa al 0.5 mol/L a temperatura ambiente durante 3 minutos. Por último, las muestras se enjuagaron dos veces durante 5 minutos con HEPES tamponado con medio cultivo M199, suplementado con 20% SSS.

4.3.3. Xenotrasplante en ratón Nude.

El comité de investigación animal de la Universidad de València aprobó el uso de animales acorde a las guías de bienestar animal actuales (2014/003/UVEG/19).

Se utilizaron 42 hembras de 6 semanas NMRI Nu/un (laboratorios Harlan, Madison, WI, US) que previamente habían sido ovariectomizadas. Se asignaron N=7 por grupo.

Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo con anestesia y analgesia: 2% de isoflurano (B.Braun, Melsungen, Alemania) y butorfanol, (4mg/ml Torphasol, AniMedica GmbH, Alemania). Para la cirugía y xenotrasplante de tejido ovárico, se realizó una laparotomía media de 1.5cm, para lo que previamente se aplicó sobre la piel del animal una solución antiséptica con povidona yodada 10%. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar y con el material esterilizado mediante autoclave. El tejido ovárico se fijó a peritoneo mediante dos puntos de sutura de prolene de 7-0 (Ethicon, New Brunswick, NJ, USA). Posteriormente la incisión se cerró por capas. Los animales estuvieron 21 días protegidos en una cabina, a una TA de aproximadamente 21º, con un área de bioseguridad libre de patógenos y ciclos de luz/oscuridad de 12/12h. Para su alimentación se utilizó agua autoclavada y pienso irradiado. Tras 21 días, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, e inmediatamente se realizó una nueva laparotomía para recuperar los fragmentos de ovario.

Dichos fragmentos de ovario se dividieron a su vez en dos:

- Uno de los fragmentos se fijó inmediatamente con formalina.
- El otro fragmento se congeló a -80º para los estudios de genómica.

Se recolectó el plasma y se almacenó a -80º para la posterior cuantificación de los niveles de estradiol.

4.3.4. Valoración histológica y de la densidad folicular.

Las muestras se fijaron en formol y se incluyeron en parafina con el objetivo de ser examinadas con el mismo procedimiento que el descrito en el apartado 2.2.2 (parte In vitro).

Brevemente:

- Los fragmentos de corteza ovárica se sometieron a un proceso de fijación, lavado, aclaramiento, inclusión, corte, tinción y montaje.
- Se realizaron cortes de 4- μ m con un micrótomo.
- Sólo se tiñó una muestra de cada 10 secciones con hematoxilina-eosina.
- Sólo se contabilizaron los folículos que tenían el núcleo presente y los morfológicamente normales.
- Fueron examinados por dos observadores diferentes (SM y SL).
- Se utilizó la misma clasificación que la nombrada en el apartado 2.2.2.

4.3.5. Cuantificación del estradiol

El estradiol se cuantificó con el kit EIA Estradiol (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). Se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante en muestras sin diluir.

Dicho ensayo está basado en la competitividad entre estradiol (E2) y el estradiol-acetilcolinesterasa conjugado (AChE), que es el marcador para un límite de antisuero de estradiol. Debido a que la concentración del marcador se mantiene constante mientras que la concentración de estradiol es variable, la cantidad de marcador que puede unirse al antisuero de estradiol será inversamente proporcional a la concentración de estradiol en la muestra. El complejo antisuero-estradiol se une a un anticuerpo monoclonal IgG anti-conejo (que ha sido previamente añadido al pocillo). Es necesario lavar la placa para eliminar cualquier reactivo que no se encuentre unido al pocillo. El producto de la reacción tiene un característico color amarillo que absorbe a 412nm. Por tanto, el producto de esta reacción (determinado mediante espectrofotometría) es proporcional a la cantidad de marcador, lo que es

inversamente proporcional a la cantidad de estradiol libre presente en la muestra.

4.3.5.1. *Preparación muestra y de los reactivos del ensayo.*

Se introducen 500 µl de muestra con una alícuota en un tubo de ensayo, y se añaden 10.000 unidades de estradiol marcado con tritio ([³H]-Estradiol). Se añade 4 veces el volumen de muestra de cloruro de metileno y se mezcla con una agitadora para permitir que las diferentes capas se separen. Posteriormente se transfiere el 90% de la capa inferior (cloruro de metileno) a un tubo de ensayo limpio, repitiendo dicho proceso dos veces. A continuación, calentamos la muestra a 30° para evaporar los extractos de cloruro de metileno. Por último, disolvemos el extracto en 0.5ml de tampón ELISA.

Para la preparación de los reactivos del ensayo, tras equilibrar la punta de la pipeta con etanol se transfieren 100µl de Estradiol ELISA Estándar en un tubo de ensayo limpio y se diluyen con 900µl de agua destilada. La concentración de la solución será de 40ng/ml (solución a granel).

A continuación, se dispondrá de 8 tubos en los que introduciremos 900 µl de tampón ELISA en el tubo número 1 y 750µl en el resto de los tubos (del 2-8). A continuación, se añade 100µl de solución a granel al tubo nº1 y se agita. Posteriormente en serie, se transfieren 500 µl del tubo nº1 y se añaden al tubo nº 2, mezclándolo bien. Luego, se vuelve a transferir 500 µl del tubo nº2 al tubo nº3, siempre agitándolo bien. Dicho proceso se repite con los tubos 4-5-6-7 y 8 (figura 23).

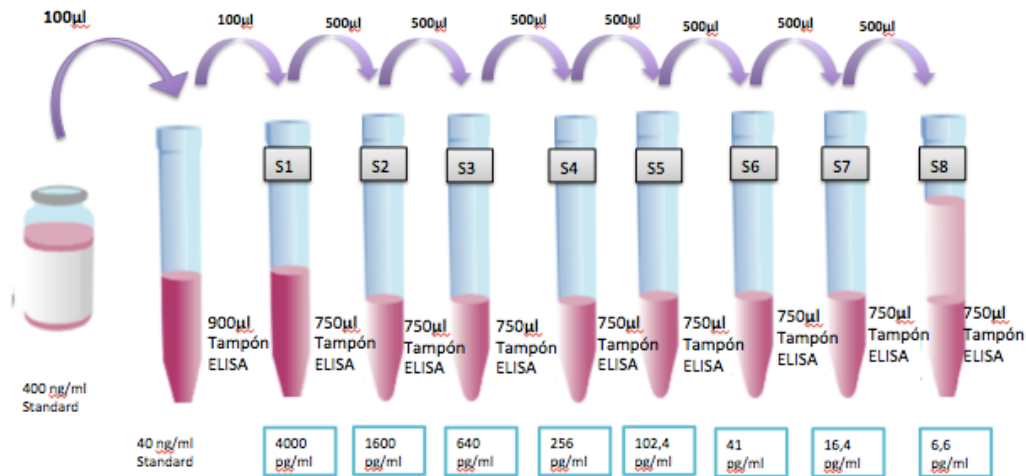


Figura 23. Preparación de los reactivos [148].

4.3.5.2. Configuración de la placa.

Para configurar la placa se colocaron dos espacios en blanco (blk), dos pocillos de enlace no especificado (NSB) y dos pocillos de enlace máximo (BO), así como una curva estándar de ocho puntos por duplicado (figura 24). Cada muestra se analizó en dos diluciones y cada dilución se analizó por triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	9	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blk: Blanco
 TA: Actividad total
 NSB: Enlace no especificado
 Bo: Máximo enlace
 S1-S8: Estándar 1-8
 1-24: Muestras

Figura 24. Configuración de la placa [148]

4.3.5.3. Realización del ensayo.

Primeramente, añadimos 100µl de tampón ELISA a los pozos NB, y 50µl a los pocillos BO. A continuación, se añaden 50µl del tubo N8 a los dos pocillos estándar más bajos (S8) y 50µl del tubo N7 a los siguiente pocillos estándar (N7). Así sucesivamente hasta completar todas las alícuotas. Posteriormente se añade 50µl de muestra estudio por pocillo. Luego se añadieron 50µl de marcador a cada pocillo, (exceptuando los pocillos TA y BLK), y 50µl de antisuero de estradiol también a cada pocillo exceptuando TA, NSB Y BLK

	Tampón ELISA	Estándar/ muestra	Marcador	Anti-suero
Blk	-			
TA	-			
NSB	100µl		50µl	
Bo	50µl		50µl	50µl
Std/ muestra		50µl	50µl	50µl

(tabla 9).

Tabla 9. Resumen de las muestras pipeteadas

Luego se cubre cada placa con film de plástico y se incuba una hora a TA en un agitador.

4.3.5.4. Análisis

Se midió la absorbancia a 405-420nm. Primero se promedió las lecturas de absorbancia de los pocillos NSB y a continuación la de los pocillos BO. Se restó el promedio de NSB con el promedio B y tuvimos la correlación máxima corregida. Luego calculamos la diferencia entre límite estándar y límite máximo para los pocillos restantes.

El LOD (límite de detección) del ensayo de estradiol fue 19pg/ml, y la interferencia con otras hormonas esteroideas fue <0.01%. La reacción colorimétrica se midió a 450nm en *Spectra Max PLUS 384* (Dispositivos moleculares, Sunnyvale, California). Se analizó cada muestra por triplicado y se expresaron los resultados en pg/ml.

4.3.6. Análisis de la vascularización y la proliferación celular en el xenotrasplante mediante inmunohistoquímica.

Se llevó a cabo un estudio de inmunohistoquímica frente a CD31 (que es un marcador de células endoteliales) para analizar la vascularización del estroma ovárico en las muestras recuperadas tras xenotrasplante. De cada muestra se obtuvieron cuatro cortes histológicos, los cuales se desparafinaron y se hidrataron (como se ha explicado en el apartado 4.2.2). Posteriormente, y con el fin de exponer los grupos enmascarados por el PFA (paraformaldehído), se incubaron las secciones en una solución pH 6 de 10mM de citrato de sodio (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) a una presión de 1.5 Bar durante 3 minutos en un microclave. Cuando se encontraban atemperadas se incubaron con una solución bloqueante de peroxidasa (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) para conseguir el bloqueo de la actividad endógena de la peroxidasa. A continuación se lavaron con TBST (*Tris buffered saline with Tween*) (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) y se incubaron con una dilución 1:20 durante 60 minutos con el anticuerpo primario anti-CD31 (JC70A, Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania). Se utilizó el método ENVISION (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante para el correcto marcaje con el anticuerpo secundario y el adecuado revelado de la señal. En concreto, las muestras se incubaron con un polímero marcado con peroxidasa conjugado con inmunoglobulinas anti-conejo y anti-ratón durante 30 minutos a TA en tampón Tris-HCl (hidroximetil aminometano, ácido clorhídrico). Terminada la incubación se añadió una solución cromogénica de DAB (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) para revelar el marcaje. El tiempo óptimo de revelado se determinó bajo microscopio óptico. Para contrastar la señal de DAB, se utilizó una tinción suave con hematoxilina. Por último, las muestras se deshidrataron con etanol y xilol y se montaron con medio Eukitt (Sigma-Aldrich, St. Louis MI). Se consiguieron 4 imágenes por sección gracias a un microscopio de campo claro Leica DM4000B (Leica Microsystems GmbH, Alemania) donde se encontraba acoplada una cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania). Las imágenes

se cuantificaron con el programa *Image Pro-plus* (Mediacybernetics, Carlsbad, CA). La MVD (*microvessel density*) se analizó como: (área CD31+ marrón/área total del tejido) x100.

Se utilizó para el control negativo un fragmento ovárico incubado con la mezcla ENVISIÓN (anticuerpo secundario) y sin el anticuerpo primario. Además, se utilizó una sección de amígdala humana como control positivo.

Con el fin de evaluar la proliferación celular en los fragmentos se realizó un estudio de inmunohistoquímica para Ki67. Se obtuvieron cuatro secciones representativas por muestra que se desparafinaron y se hidrataron (como se ha explicado en el apartado 4.2.2). A continuación, y para exponer los grupos enmascarados por el PFA, se incubaron las secciones en una solución pH 6 de 10mM de citrato de sodio (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) a una presión de 1.5 Bar durante 3 minutos en un microclave. Cuando se encontraban atemperadas se incubaron con una solución bloqueante de peroxidasa (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) para conseguir el bloqueo de la actividad endógena de la peroxidasa. Posteriormente se lavaron con TBST (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) y se incubaron con una dilución 1:100 durante 60 minutos con el anticuerpo primario anti-Ki67 (MIB-1, Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania). Para la incubación con el anticuerpo secundario y el revelado de señal, se utilizó el método ENVISION (Dako Denmark A/S, Glostrup, Alemania) tal y como indican las instrucciones del fabricante (explicado anteriormente). Con el fin de contrastar la señal de DAB, se utilizó una tinción suave con hematoxilina. Para finalizar, las muestras se deshidrataron con etanol y xilol y se montaron con medio Eukitt (Sigma-Aldrich, St. Louis MI). Se contaron el número de células Ki 67+ (es decir las que tenían el núcleo teñido de marrón) en las distintas secciones con un microscopio de campo claro Leica DMI 4000B (Leica Microsystems GmbH, Alemania). Además, se tomaron imágenes representativas con la cámara digital Leica DFC450C (Leica Microsystems GmbH, Alemania). Para cuantificar el área de tejido se utilizó el programa *Image J* (National Institute of Health). El cálculo del porcentaje de

proliferación se obtuvo mediante la siguiente fórmula: (nº células Ki 67+/área total del tejido) x100.

Para el control negativo del marcaje utilizamos una sección ovárica, la cual se incubó con el anticuerpo secundario (solución ENVISIO), pero no con el anticuerpo primario. Añadir que como control positivo se utilizó una muestra de endometrio humano.

4.3.6.1. *Análisis de fibrosis mediante tinción con tricómico de Masson*

Para demostrar elementos del tejido conectivo, así como, colágeno y fibras musculares utilizamos la tinción tricrómica de Masson. Gracias a ella, tanto la mucina como el colágeno se colorearán en azul, en rojo la queratina, el citoplasma y las fibras musculares y por último los núcleos en azul/negro.

Dicha tinción se realizó sobre todas las secciones de todos los implantes recuperados. Previamente las muestras fueron fijadas en formol y embebidas en parafina.

Tras colocar el portaobjetos en el reactivo fijador de Bouin a 60º se deja que las muestras se enfríen. A continuación, se mezcla a partes iguales el reactivo A y B de hematoxilina de Weigert y se colocan allí las muestras. Posteriormente se aplica escarlata de Biebrich y no se enjuaga. Todos los elementos acidófilos del tejido como el citoplasma, el músculo y el colágeno se unirán a los tintes ácidos. Posteriormente se aplican los ácidos de fosfomolibdico y fosfotúngstico los cuales tampoco se enjuagan. Dado que el citoplasma es mucho menos permeable que el colágeno, estos ácidos permiten que el escarlata de Biebrich difunda del colágeno, pero no del citoplasma. Después se aplica el reactivo de azul de anilina. Destacar que los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico tienen múltiples grupos ácidos que probablemente actúen como medio de unión entre el azul de anilina (que es el tinte del colágeno) y el colágeno. Además, es posible que el pH de la solución fosfomolibdico/ fosfotúngstico aumente la coloración y ayude al colágeno en la difusión o retiro de los colorantes. Luego se aplica ácido acético glacial al 1% y finalmente se deshidrata con etanol.

Las imágenes se obtuvieron gracias a un microscopio de campo claro Leica DM4000B (Leica Microsystems GmbH, Alemania) a 20x. Se tomaron 4 imágenes por muestra que se analizaron con el software Image Pro-plus (Mediacybernetics; Carlsbad, CA).

4.4. Análisis estadístico

Los datos están presentados como medias y desviación estándar (SD) cuando las muestras presentaban una distribución normal, o como medianas y rango intercuartílico (IQR). Para evaluar los resultados entre grupos se utilizó el test de Friedman seguido de Test post-hoc de Wilcoxon.

Los valores de $p < 0.5$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Además, todo el análisis estadístico fue llevado a cabo usando el programa estadístico SPSS 20.0 (IBM España, Madrid, España).

5. Resultados

Dividiremos los resultados en dos apartados principalmente; por una parte, los resultados obtenidos tras los estudios experimentales in vitro, y por otra parte los resultados obtenidos tras los estudios in vivo.

5.1. Resultados de estudios experimentales in vitro.

5.1.1. Evaluación histológica y del conteo folicular.

Durante la evaluación histológica, observamos que las células del estroma y los folículos se conservaron adecuadamente en todos los grupos tras las diferentes técnicas de decorticación. No se observaron signos morfológicos evidentes de daño celular o pérdida de la estructura del tejido ovárico evidentes ni a nivel macroscópico ni durante el examen histológico de las muestras.

Destacar también que después del cultivo, los fragmentos recuperados no diferían ni en su tamaño ni en su espesor entre los distintos grupos sometidos a decorticación, aunque evidentemente éstos sí que eran fragmentos más delgados que en el grupo control donde no se había aplicado ninguna técnica para eliminar la médula ovárica (tabla 10):

Grupo	C	B	M	S
Tamaño fragmento(mm)	3.4[3.1-4.3]	4.0[2.4-4.7]	3.7[3.1-5.0]	3.1[3-4.3]
Espesor fragmentos (mm)	2.3[2.0-3.0]	1.9[1.2-2.3]	1.7[1.4-2.1]	1.5[1.2-1.6]

Tabla 10. Tamaño y espesor de los fragmentos, expresados como mediana e IQR.

Con respecto a los folículos morfológicamente normales, los valores calculados en los diferentes grupos se muestran a continuación (tabla 11). No se hallaron diferencias con significación estadística.

Grupo	Medianas (IQR)	p-valor
C	61.8 [21.9-73.9]	
B	73.3 [58.9-90.0]	NS
M	60.0[40.0-71.8]	NS
S	76.5[42.4-92.8]	NS

Tabla 11. Medianas (IQR) de normalidad folicular en los diferentes grupos, p-valor respecto grupo control.

Aunque los porcentajes de folículos morfológicamente normales fueron ligeramente superiores en los grupos en los que se realizó la decorticación con bisturí y con slicer, tampoco se encontraron diferencias significativamente estadísticas entre los diferentes grupos.

Pese a los datos de normalidad morfológica folicular también encontramos folículos anormales. Las características principales observadas en estos folículos fue el desprendimiento de la lámina basal, así como la disminución del ooplasma.

Para el adecuado conteo folicular calculamos tanto los porcentajes de poblaciones foliculares en cada grupo, así como las densidades foliculares por mm³ y aparte de la clasificación clásica, también dividimos a los folículos en función de si se encontraban quiescentes o en crecimiento. En rasgos generales, observamos que las muestras analizadas contenían principalmente folículos primarios, primordiales y secundarios. No encontramos folículos antrales.

Destacar que se realizó un análisis de correlación intraobservador e interobservador para las diferentes clases de folículos. Así, el coeficiente de correlación intracase osciló entre 0.813 (IC del 95%: 0.671- 0.948) y 0.991 (IC del 95%: 0.870- 0.998). La concordancia fue total entre las observadoras para evaluar la presencia/ausencia de folículos.

Así pues, las densidades foliculares expresadas en folículos/mm³ se detallan a continuación expresadas como mediana (IQR), (tabla 12):

Grupo	Densidad folicular (fol/mm ³)				p-valor
	Primordiales	Primarios	Secundarios	Total	
C	19.3 [2.2, 52.5]	3.0 [0.0-8.1]	0.0 [0.0-3.5]	29.2 [3.1-80.4]	
B	15.3 [60.7, 31.2]	2.7 [0.0-6.2]	0.0 [0.0-2.0]	20.4 [8.2-37.5]	NS
M	19.1 [8.3, 85.8]	3.3 [2.6-5.3]	1.0 [0.0-2.6]	21.9 [12.6-90.9]	NS
S	21.3 [4.5, 54.8]	0.7 [0.0, 5.5]	0.0 [0.0-0.8]	27.1 [11.2-55.5]	NS

Tabla 12. Densidades foliculares en los diferentes grupos expresados como medianas (IQR), p-valor respecto grupo control.

Es decir, la densidad folicular fue similar entre grupos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a densidades foliculares cuando comparamos folículos primordiales (figura 25), folículos primarios (figura 26) y folículos secundarios.

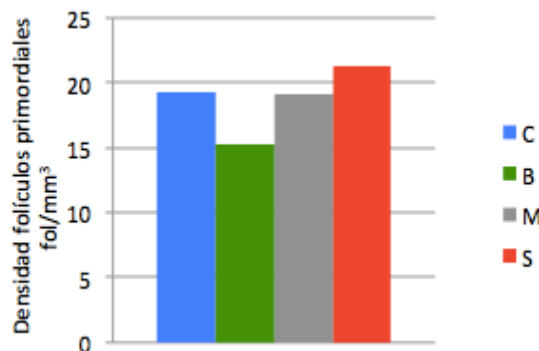


Figura 25. Densidad de folículos primordiales en cada uno de los grupos.

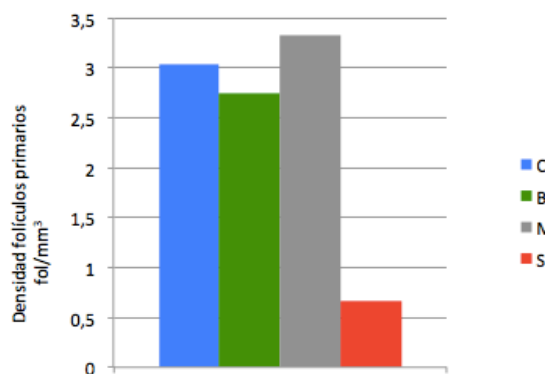


Figura 26. Densidad de folículos primarios en cada uno de los grupos.

Como hemos señalado con anterioridad, dividimos a los folículos en función de si se encontraban quiescentes (es decir, folículos primordiales) o en crecimiento (folículos primarios y secundarios). Los datos se muestran en la siguiente tabla (tabla 13):

Grupo	Poblaciones foliculares (%)		p-valor
	Quiescentes	Crecimiento	
C	70.9 [16.6-97.1]	19.2 [2.9-83.4]	
B	83.5 [62.0-92.5]	16.5 [7.5-38.1]	NS
M	87.0 [67.8-95.1]	13.0 [4.9-32.2]	NS
S	91.1 [48.0-100.0]	9.9 [0.0-62.0]	NS

Tabla 13. Porcentaje de folículos quiescentes y en crecimiento expresados como mediana (IQR) para cada grupo, p-valor respecto grupo control.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los folículos quiescentes, así como tampoco en los folículos en crecimiento en ninguno de los grupos experimentales donde fue retirada la médula de la corteza.

5.1.2 Evaluación de viabilidad mediante TUNEL

Analizamos el marcado TUNEL en estroma y en los folículos, y también en el grupo control y en cada uno de los grupos sometidos a diferentes técnicas de decorticación (figura 27).

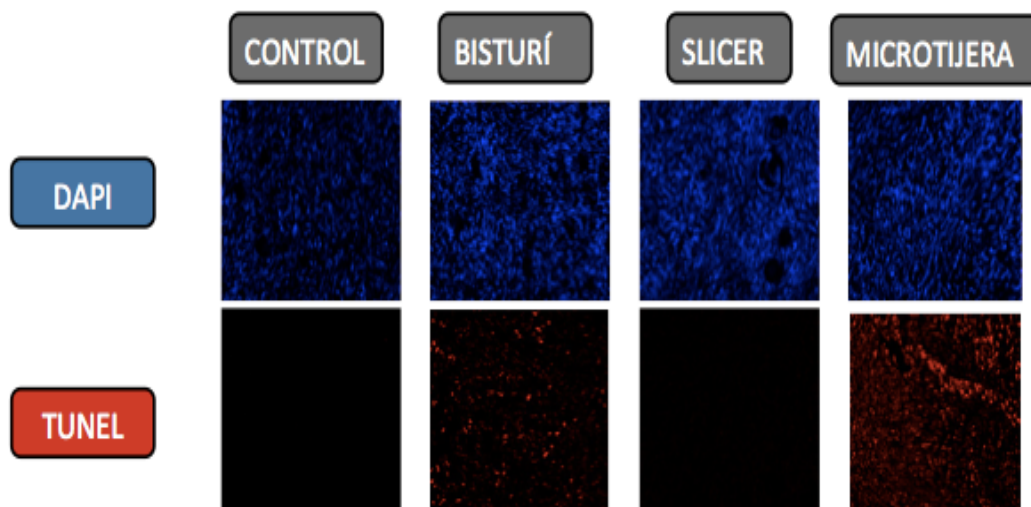


Figura 27. Imágenes de TUNEL en cada uno de los grupos.

Para poder evaluar correctamente el daño celular, se establecieron 4 categorías en función de la localización y cantidad de señal TUNEL positiva en los folículos (como se ha explicado en la tabla 18, apartado 4.2.3 de material y métodos).

Reseñar que todas las muestras analizadas contenían solo folículos de tipo I y folículos de tipo II (figura 28)

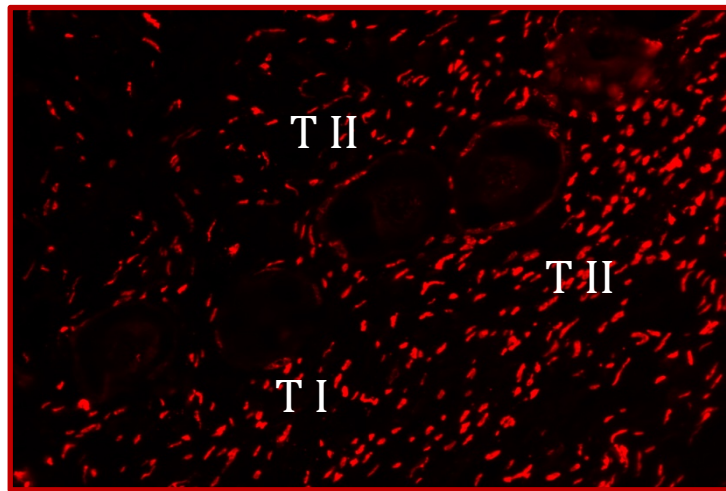


Figura 28. Imagen de TUNEL en los folículos

Es decir, no se encontró ningún folículo con señal positiva TUNEL en el ovocito de un total de 411 folículos examinados. Los datos de los folículos tipo I y tipo II, así como los datos de señal positiva TUNEL en el estroma se muestran a continuación expresados como medias y DS (tabla 14):

Grupo	Folículos		Estroma ovárico	p-valor
	Tipo I (%)	Tipo II (%)	Área TUNEL+ en estroma (%)	
C	98.3±3.2	1.3 ± 2.8	2.4 ± 6.4	
B	96.7±9.3	2.0 ± 5.6	9.2 ± 14.3	NS
M	84.3±31.5	15.7 ± 35.0	17.8 ± 21.1*	<0.05
S	87.2±33.1	1.7 ± 5.7	1.1 ± 3.1	NS

Tabla 14. Cuantificación TUNEL en folículos y estroma. Media (DS)

Por tanto, sí se detectó un aumento 7 veces mayor del área apoptótica en el estroma de las muestras en las que se retiró la médula con tijera microquirúrgicas. Con estos datos, al realizar el análisis estadístico se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto el grupo de decorticación con Microtijera Vs grupo Control (M vs C, $p < 0.05$).

5.1.3 Cuantificación Caspasa 3 activada

Para tener mayor información sobre el daño apoptótico, se cuantificó la Caspasa 3 mediante PRC en tiempo real (tabla 15)

Grupo	ΔCt en estroma	p-valor
C	12.4 [9.6, 15.6]	
B	12.2 [8.2, 15.6]	NS
M	11.1 [7.0, 14.6]	NS
S	9.8 [6.9, 11.3]	NS

Tabla 15. Caspasa 3 activada medida mediante qPCR en estroma.

No se detectaron diferencias cuando se comparó ΔCt de los grupos experimentales con los controles ($p > 0.05$).

5.1.4 Cuantificación del TNF- α

Cuando se analizó la secreción de TNF- α en el medio de cultivo, con tal de cuantificar el grado de inflamación en las diferentes muestras se obtuvieron los siguientes datos (figura 29)

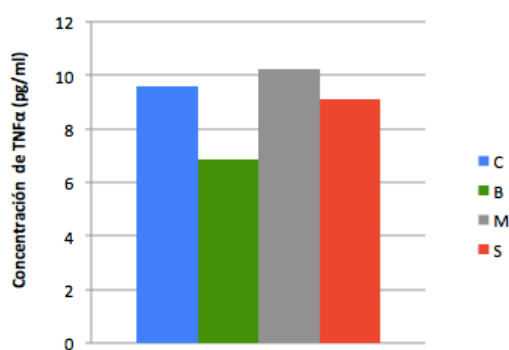


Figura 29. Concentración de TNF- α en medio de cultivo en los diferentes grupos.

En el análisis estadístico, sí que se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos el grupo B con el grupo control (B: 6.84 [6.71, 8.55] vs C: 9.57 [7.82, 10.82], $p=0.013$), siendo menor la secreción de TNF- α en el grupo B. No obstante, no se observaron diferencias en los grupos M (10.25 [6.43, 12.57] ni S (9.12 [7.01, 11.87])).

5.1.5 Cuantificación de HSP- 60

Para cuantificar los valores de HSP-60 tuvimos que calcular primero los valores de ΔCt . para cada grupo (para normalizar el valor de Ct de cada muestra respecto al control endógeno), para posteriormente, poder calcular $\Delta\Delta Ct$ para cada grupo (para normalizar respecto a la muestra control o calibrador) como muestra la tabla 16:

Muestra	C	B	S	M
1	0	4,2487	1,4815	-1,7013
2	0	-3,1202	-8,5708	-9,5428
3	0	3,5339	-3,0338	-4,4771
4	0	6,6009	-1,1292	3,2812
5	0	0,3148	-0,7233	5,8832
6	0	-0,5347	11,2425	5,9868
7	0	5,1370	3,1497	3,0085

Tabla 16. Valores de $\Delta\Delta Ct$ para cada grupo.

Finalmente analizamos y calculamos el *fold change* para cada grupo (tabla 17):

Grupo	Fold change	p-valor
B	1.3 \pm 3.0	NS
M	4.2 \pm 8.2	<0.05
S	1.9 \pm 2.9	NS

Tabla 17. Valores de fold change para HSP-60 en los diferentes grupos.

Por tanto, encontramos que su expresión era similar en el grupo B y en el grupo S comparado con el control.

No obstante, se encontró que su expresión se encontraba aumentada con significación estadística cuando utilizamos las microtijeras quirúrgicas para separar la médula de la corteza.

5.1.6. Expresión relativa de los genes de la ruta Hippo.

A continuación (figura 30) se expresan los datos relacionados con la expresión relativa de los genes de la ruta Hippo:

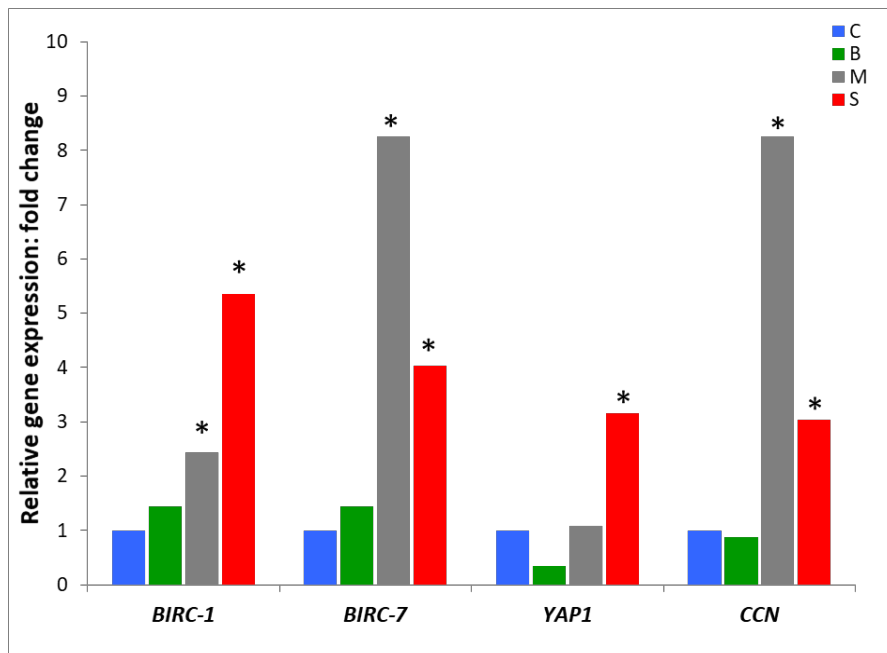


Figura 30. Expresión relativa de genes de la ruta Hippo tras los diferentes procedimientos de decorticación.

Como se muestra en la figura, la expresión relativa de todos los genes de la ruta Hippo se encontraba aumentada cuando se utilizó tanto la microtijera quirúrgica como el slicer como métodos de decorticación, lo que se traduce en que ambos métodos provocaron la inhibición de la ruta Hippo.

No obstante, la decorticación con bisturí no modificó la expresión relativa de estos genes en comparación con las muestras control (en las cuales no se extrajo la médula ovárica y por tanto la vía no se interrumpió).

5.2. Resultados de estudios experimentales in vivo.

5.2.1. Evaluación histológica y conteo folicular.

Al igual que para el conteo folicular de la parte experimental in vitro, para la presente parte también nos basamos en la histología del tejido teñido con

H&E; observándose el ovocito tintado con eosina y las células de la granulosa tintadas con hematoxilina.

En cuanto al tamaño de los fragmentos sometidos a xenotrasplante observamos que éstos habían disminuido su tamaño 21 días después. Destacar que no encontramos folículos antrales, pero si primordiales, primarios y secundarios y que, aunque el número de folículos totales había disminuido en todos los casos, los folículos restantes presentaban una adecuada y mantenida morfología y no mostraban evidencia de daño celular.

Además, tras establecer el porcentaje de folículos morfológicamente anormales (los valores oscilaron entre 0 y 3% en todos los grupos experimentales), no se encontraron diferencias significativamente estadísticas entre las muestras xenoinjertadas y los controles (no xenoinjertados).

Como realizamos en la parte In vitro, para un adecuado contaje folicular calculamos tanto los porcentajes de poblaciones foliculares en cada grupo y para cada técnica de criopreservación (vitrificación y congelación lenta) así como las densidades foliculares por mm³ y comparamos dichas poblaciones con el grupo control (no xenotrasplantado).

Cuando la densidad folicular total (expresadas en fol/mm³) de cada grupo de intervención se comparó con el grupo control (C: 3.3[0.7-23.4]), se detectó una reducción estadísticamente significativa en todos los grupos criopreservados mediante congelación lenta SF (B-SF:0.3[0.0-1.0], M-SF: 0.7[0.0-1.2] y S-SF:0.2[0.0-1.2], p=0.04), así como en todos los grupos criopreservados mediante vitrificación (B-VT: 0.2[0.1-2.6], M-VT: 0.4[0.0-1.6] y S-VT (0.3[0.0-0.6], p=0.01).

No obstante, cuando se compararon las distintas técnicas de decorticación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ni tampoco entre las muestras injertadas para cada método de criopreservación (figura 31):

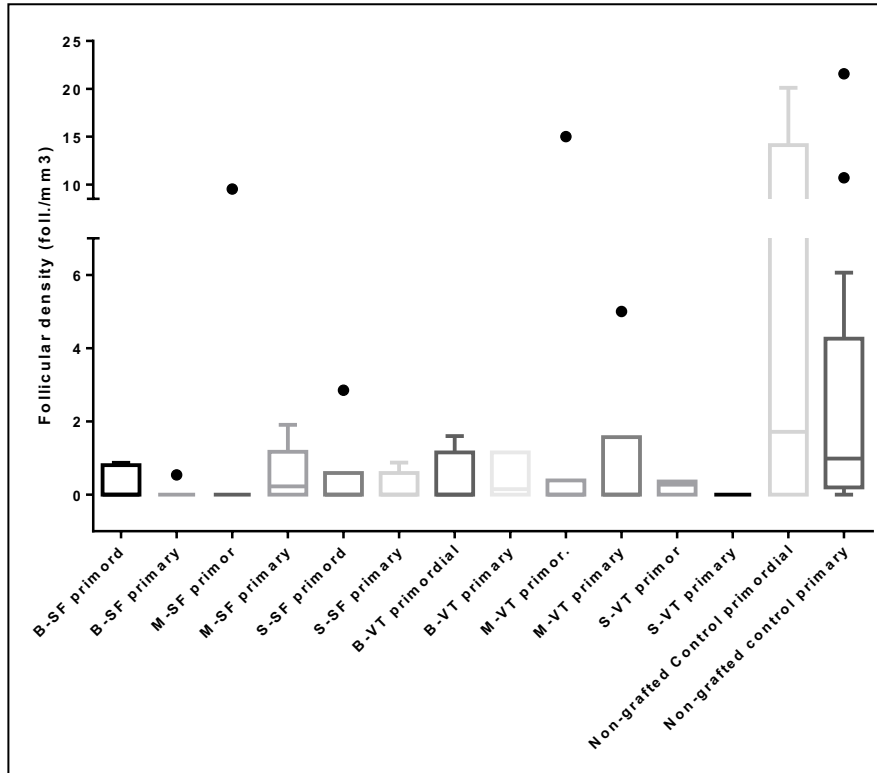


Figura 31. Diagrama de cajas y bigote para densidades foliculares totales. Muestras in vivo.

A continuación, evaluamos las densidades de cada subgrupo folicular (primordiales, primarios y secundarios), como se muestra en la siguiente tabla (tabla 18):

Grupo	Densidad folicular (foll/mm ³)			Totales
	Primordiales	Primarios	Secundarios	
Control (C)	1.7 [0.1-12.2]	1.0 [0.3-3.2]	0.1 [0.0-0.7]	3.3 [0.9-19.4]
B+SF	0.0 [0.0-0.8]	0.0 [0.0-0.0]*	0.0 [0.0-0.0]	0.3 [0.0-0.8]
M+SF	0.0 [0.0-0.0]*	0.2 [0.0-1.1]	0.0 [0.0-0.1]	0.7 [0.0-0.9]
S+SF	0.0 [0.0-0.6]	0.0 [0.0-0.6]*	0.0 [0.0-0.0]	0.2 [0.0-0.8]
B+VT	0.0 [0.0-1.1]	0.2 [0.0-1.2]	0.0 [0.0-0.1]	0.2 [0.1-2.5]
M+VT	0.0 [0.0-0.4]	0.1 [0.0-1.2]	0.0 [0.0-0.0]	0.1 [0.0-1.0]
S+VT	0.3 [0.0-0.4]	0.0 [0.0-0.0]*	0.0 [0.0-0.0]	0.3 [0.0-0.5]

Tabla 18. Densidades foliculares por subpoblaciones. Muestras In vivo. Medianas [IQR].

Se detectó una reducción estadísticamente significativa de la población de folículos primordiales en el grupo M-SF ($p=0.02$), y una disminución en la población de folículos primarios cuando se comparó el grupo B-SF, S-SF Y S-VT de las muestras xenotrasplantadas con el grupo control ($p=0.002$, $p=0.03$ y

p=0.02 respectivamente). No obstante, dichos hallazgos no se encontraron en ninguno de los otros grupos experimentales, ni cuando se compararon los resultados de las diferentes técnicas con cada tipo de criopreservación, ni tampoco cuando comparamos folículos quiescentes en cada uno de los grupos.

Y para un análisis más completo, también realizamos la clasificación en función de si los folículos se encontraban quiescentes o en crecimiento (tabla 19).

Poblaciones foliculares (%)		
Grupo	Fol. Quiescentes	Fol. Crecimiento
Control (C)	50.0[34.8-77.7]	50.0[22.3-65.2]
B+SF	100.0 [60.0-100.0]	0.0 [0.0-40.0]
M+SF	0.0 [0.0-62.5]	100 [37.5-100]
S+SF	61.1 [12.5-93.1]	38.8 [6.9-87.5]
B+VT	0.0 [0.0-55.6]	100.0 [44.4-100]
M+VT	70.8 [16.7-93.8]	29.2 [6.2-83.3]
S+VT	100 [58.3-100]	0.0 [0.0-41.7]

Tabla 19. Poblaciones foliculares. Muestras in vivo. Mediana (IQR)

5.2.2 Evaluación de la vascularización y la proliferación celular.

Se analizaron todas las muestras obtenidas tras el xenotrasplante tanto para cada técnica de preservación, así como para cada método de separación médula-corteza.

Si nos centramos en la vascularización, observamos que los injertos ováricos crioconservados mediante VT (B-VT:1.5 [0.0-2.1], M-VT:1.4 [0.5-1.6] y S-VT:1.3 [0.3-1.8]) mostraron un aumento general en el área vascularizada (CD31+) cuando se compararon con los crioconservados mediante congelación lenta para cada técnica de decorticación (B-VT: 0.31 [0-0.9], M-VT: 1.8 [1.2-3.4] y S-VT: 0.5 [0.3-1.5]; p=0.0036).

Dentro de las muestras crioconservadas mediante SF, tanto el uso de microtijera quirúrgica como el uso de slicer incrementaron la MVD en

comparación con el grupo de cuchilla ($p=0,0006$ y $p= 0.03$ respectivamente). Dichas diferencias no se observaron en las muestras vitrificadas independientemente del método de decorticación utilizado (figura 32):

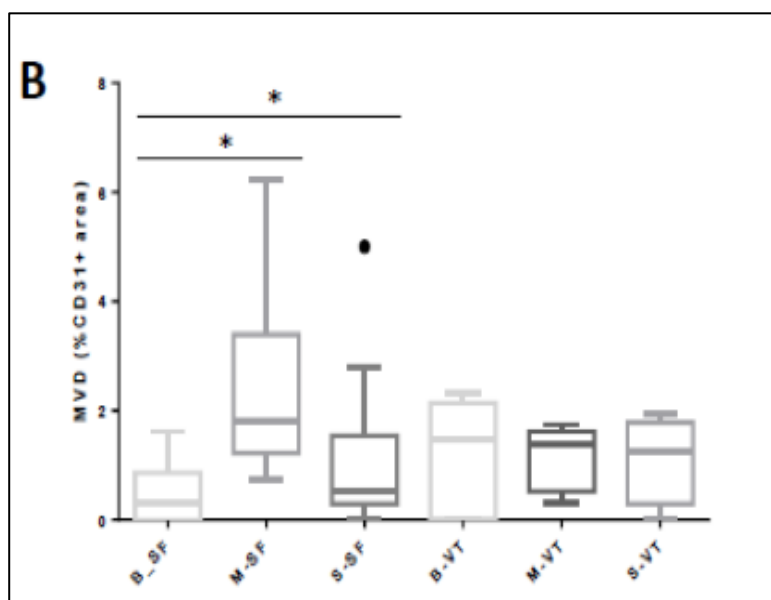


Figura 32. MVD expresada como diagrama de cajas y bigotes para cada grupo.

En lo que respecta a la proliferación celular evaluada mediante la positividad de las células para Ki67, no se detectaron diferencias en ningún caso (ni para los diferentes métodos de criopreservación ni para las diferentes técnicas de decorticación), tabla 20:

	B-SF	M-SF	S-SF	B-VT	M-VT	S-VT
MVD (%)	0.31 [0-0.9]	1.8 [1.2-3.4]	0.5 [0.3-1.5]	1.5 [0.0-2.1]	1.4 [0.5-1.6]	1.3 [0.3-1.8]
Proliferación (%)	0.0 [0.0-0.1]	0.1 [0.0-0.3]	0.0 [0.0-0.1]	0.2 [0.0-0.2]	0.6 [0.1-1.2]	0.1 [0.0-0.1]
Fibrosis (%)	37.7 [27.6-44.2]	45.2 [38.0-48.0]	24.1 [12.4-34.4]	41.9 [31.3-49.6]	36.2 [19.1-50.2]	19.0 [6.9-21.3]

Tabla 20 Estatus del estroma ovárico tras xenotrasplante. Valores expresados como mediana (IQR).

En cuanto al estudio de la fibrosis en el xenoinjerto, observamos que no habían diferencias para las muestras decorticadas con el mismo método pero criopreservadas con diferente sistema (figura 33):

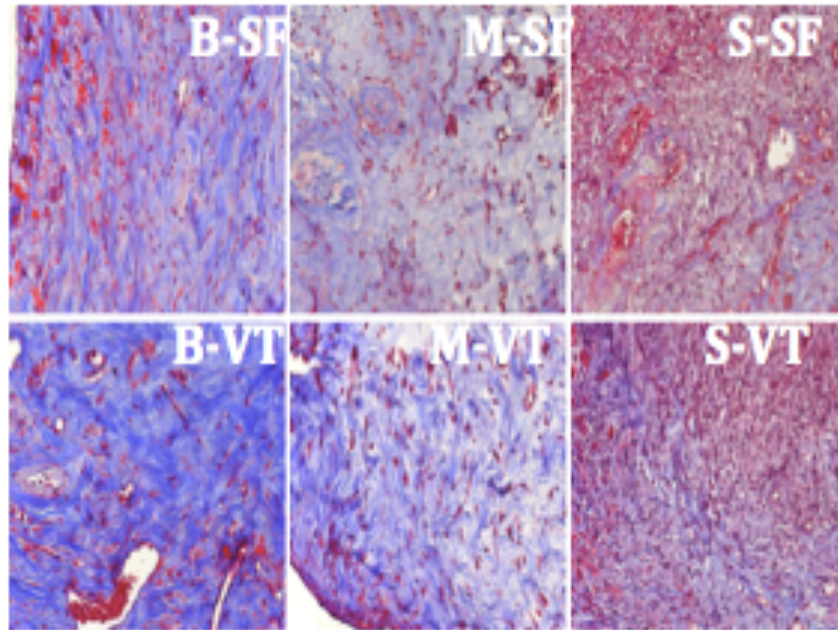


Figura 33. Imágenes tinción tricrómica de Masson a 20X (aumentos). Muestra el colágeno en azul y núcleos en rosa/rojo.

No obstante dentro de las muestras sometidas a congelación lenta, el uso del slicer redujo el área fibrótica en un 24.1% en comparación con un 37.7% inducido por el bisturí y el 45.2% del grupo de microtijera ($p=0.009$).

El mismo patrón también se observó en las muestras vitrificadas: el uso de slicer (19.0%) redujo el área fibrótica cuando se comparó con el grupo de bisturí (41.9%) y con el grupo de microtijera (36.2%) con una $p=0.02$ y $p=0.0004$ respectivamente (figura 34):

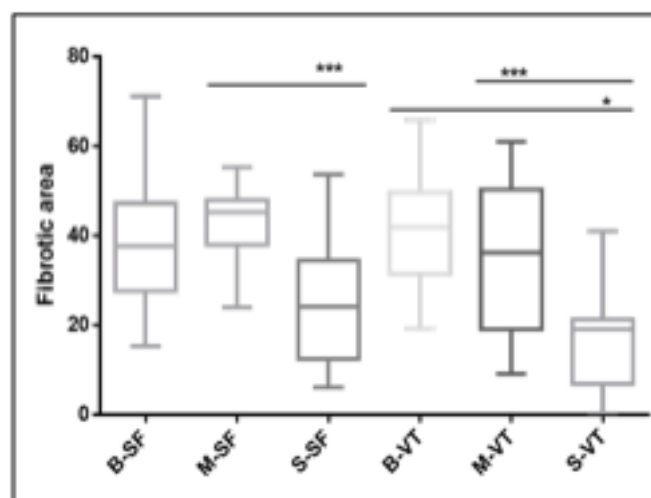


Figura 34. Área fibrótica expresada como diagrama de cajas y bigotes para cada grupo

5.2.3. Evaluación del estradiol

El estradiol se cuantificó en el plasma de todas las ratonas NUDE, como prueba conceptual de la función endocrina de los injertos de tejido ovárico.

Es importante señalar que todas las ratonas trasplantadas presentaron una producción de estradiol en plasma. Los valores variaron dependiendo del momento del ciclo en el cual se obtuvo el análisis. Aun así, todos los valores estuvieron en un rango entre 10.9-206.7pg/ml (figura 35):

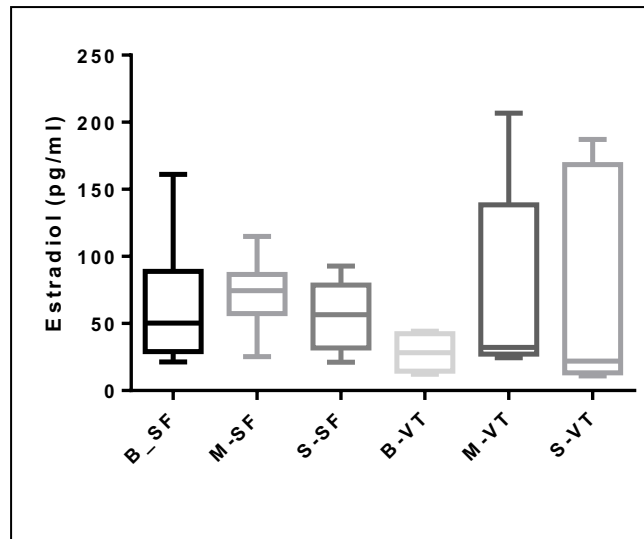


Figura 35. Niveles de estradiol en plasma de las ratonas, expresados como diagrama de cajas y bigotes.

No se realizó el análisis estadístico para comparar valores entre grupos porque las muestras se obtuvieron el día 21, en el sacrificio, independientemente de la fase del ciclo ovárico en el que se encontrara cada animal.

6. Discusión

Se ha logrado con éxito preservar la fertilidad de numerosas pacientes gracias a la criopreservación y posterior reimplante de tejido ovárico. Es por ello, que tanto los científicos como los médicos han reclamado que el procedimiento se tenga en consideración como una técnica establecida en todo el mundo [149].

Un escollo importante para que se produzca tal acontecimiento es la falta de una técnica escalonada y estandarizada que sea aplicable en todas las unidades de preservación de la fertilidad. La falta de uniformidad en la práctica clínica se podría atribuir a la constante investigación que se está llevando a cabo en la última década para evaluar el impacto de diferentes factores involucrados en el complejo procedimiento que supone dicha técnica y que, además, consta de varios y sucesivos pasos.

No obstante, los estudios actuales se están centrando en la criopreservación y en el trasplante, pero existen otros factores como el tamaño de los fragmentos o el grosor de los mismos que también parece ser crucial para determinar el éxito en los sucesivos pasos y por tanto deben ser tenidos en cuenta [49]. Según nuestro conocimiento, éste sería el primer estudio que evalúa sistemáticamente las técnicas de decorticación usadas en la actualidad por los diferentes programas de preservación de la fertilidad.

Dado que nuestro objetivo era identificar la forma menos lesiva de separación médula-corteza optamos por cuantificar y evaluar la viabilidad folicular y estromal, la inflamación y el estrés mecánico del tejido en el estudio in vitro para posteriormente obtener una visión más completa gracias al estudio in vivo donde utilizamos diferentes formas de criopreservación. Además, evaluamos también el efecto que supone el reimplante sobre el injerto.

Por una parte, valoramos el estrés mecánico ya que ello podría conducir a la activación de moléculas proinflamatorias. Nos decantamos por el estudio de

las proteínas de choque térmico (Heat shock protein en inglés, HSP) debido a que son proteínas presentes en todas las células de nuestro cuerpo, encargadas de regular la función y conformación de numerosas proteínas celulares con el fin de protegernos del estrés [150]. Dichas proteínas pueden ser expresadas en condiciones normales, pero también ante diversos tipos de estrés ambiental o endógeno [151] y se localizan tanto intracelularmente como extracelularmente. Intracelularmente funcionan como chaperonas moleculares soportando el plegamiento y el transporte de multitud de polipéptidos y proteínas y actúan tanto en condiciones fisiológicas como siguiendo estímulos de estrés. Extracelularmente (donde generalmente van acompañadas de otras proteínas) desencadenan una potente respuesta inmune [152]; es decir, son en situaciones de lesión y/o necrosis, donde son potencialmente patológicas, ya que ubicadas en espacios extraños, activan la cascada proinflamatoria. Es su desacoplamiento el que activa los receptores que a su vez disparan una cascada de señales intracelulares que provocan la expresión de genes proinflamatorios [153].

Evaluamos además la inflamación. La inflamación puede iniciarse como respuesta al reconocimiento de un daño en el ADN [154]. En respuesta a dicho daño, los macrófagos producen factor de necrosis tumoral (TNF α) que se comporta como mediador de la inflamación y posee efectos tanto estimulante como inhibidores de la proliferación. Se trata de una citoquina con una masa molecular relativa de 17 kDa (kiloDalton) que amplifica y prolonga la respuesta inflamatoria puesto que activa otras células que a su vez como respuesta, liberan citoquinas (como IL-1) y otros mediadores (óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, eicosanoides) [155]. Todo ello, potencia el proceso inflamatorio y acaba provocando una lesión tisular. Además, la autolimitación del proceso inflamatorio se caracteriza por una disminución de la actividad del TNF α [153].

También, gracias a la técnica TUNEL hemos podido evaluar la apoptosis a través de la fragmentación del ADN. La fragmentación del ADN es uno de los fenómenos finales que se da como consecuencia de la activación de las rutas

de muerte celular, y donde las roturas de la cadena de ADN se pueden detectar marcando enzimáticamente los extremos 3'-OH libres con nucleótidos modificados [156].

Pero además de todos los marcadores anteriormente descritos, el desarrollo funcional de un órgano requiere de mecanismos que le confieran una identidad adecuada y también, de mecanismos de regulación del crecimiento que especifiquen el tamaño final del órgano. Es aquí donde la ruta Hippo tiene su papel fundamental ya que controla el tamaño del órgano al regular coordinadamente tanto la proliferación y crecimiento celular como la apoptosis [157]. En cuanto a la ruta Hippo, se trata de una ruta de señalización inhibitoria que actúa en una cascada de cinasas que finalmente fosforila e inactiva los principales efectores de la ruta (YAP). Cuando se interrumpe la ruta, disminuye la fosforilación de YAP y por tanto aumentan sus niveles, lo que tras unirse a ciertos factores transcripcionales, aumenta el crecimiento de factores CCN y de los inhibidores de la apoptosis (BIRC) [157]. Decir también que las proteínas CCN estimulan la proliferación celular el crecimiento y la supervivencia [158].

Por tanto, la fragmentación ovárica aumenta la polimerización de la actina y disminuye los niveles de YAP fosforilado lo que provoca un aumento nuclear de YAP, y un aumento de expresión de los factores de crecimiento CCN e inhibidores de la apoptosis BIRC [159]. Todo ello, se puede resumir como un método de activación ovárica in vitro, donde gracias a la fragmentación ovárica se promueve con éxito el crecimiento de folículos residuales en cortezas ováricas, y donde además ya hay reportado gracias a ello un nacimiento mediante técnicas de reproducción asistida [159].

Si nos centramos en la parte in vitro y en cada uno de los métodos utilizados, podemos destacar que el uso de las microtijeras quirúrgicas (M), aunque inicialmente parece que preservó el número total de folículos, también se observó que indujo un aumento en las anomalías foliculares seguido de un aumento de 7 veces la muerte celular estromal y de la ruta Hippo, lo cual tiende a provocar una activación folicular masiva [159] y por tanto un

agotamiento folicular [160]. Sin embargo, las proporciones entre las poblaciones en crecimiento y las poblaciones en reposo parece que no se vio alterada con el uso de microtijeras quirúrgicas, ni tampoco con ninguno de los otros métodos evaluados (en comparación con las muestras control). No obstante, la ausencia de efectos evidenciables se podría atribuir al período limitado entre la decorticación y el examen de la muestra. Es decir, puede que tres horas no sean suficientes para detectar cambios morfológicos debido al crecimiento folicular [161].

Éstos hallazgos se acompañan de una cascada de eventos que implican moléculas de estrés como la HSP60 que como hemos comentado induce inflamación [151], y dado que en una proteína derivada (también nombrada con anterioridad, TNF- α) no se observó que se produjera un aumento, se podría sugerir la posibilidad de un mecanismo de reparación tisular en un intento de la célula de aminorar el daño promovido en las muestras tratadas con microtijera quirúrgica. De hecho, la proporción de folículos de buena calidad (según la clasificación Martínez-Madrid et al 2004 [162] tipo I y tipo II (ovocito TUNEL negativo y porcentaje de CG apoptóticas inferior al 10%), no fue diferente cuando se compararon los grupos entre sí, ni en comparación con controles. Sin embargo, los mecanismos de reparación podrían no recuperar completamente el daño y por lo tanto el aumento del estrés mecánico en la decorticación podría conducir a un daño mecánico (que afectara tanto a los folículos como a la viabilidad del estroma).

La decorticación mediante raspado con hoja de bisturí o mediante slicer no indujo una pérdida folicular, ni anormalidades morfológicas, ni daño en el estroma celular o estrés mecánico. Pero el slicer provocó la modificación de la expresión de los genes de la ruta Hippo, lo que se caracterizó en un incremento significativo de la expresión de los genes *BIRC1*, *BIRC7*, *YAP1* y *CCN2* [157, 159] (como en las muestras decorticadas mediante microtijera quirúrgica), lo cual propicia que se pueda iniciar la activación folicular. Sería conveniente que dicho fenómeno se evitara durante los pasos iniciales de preparación del tejido, ya que es bien conocido que una vez se han activado

los folículos, éstos continuarán su desarrollo o bien sufrirán atresia y por tanto la muerte [163]. Éste es un aspecto importante relacionado también con el grosor de los fragmentos [49], donde los folículos activados no sobrevivirían a los sucesivos procesos de criopreservación, descongelación y trasplante. Es más, el agotamiento folicular inducido tanto por la isquemia durante los primeros momentos tras el trasplante como por el reclutamiento folicular debido a la ausencia de folículos en crecimiento que segreguen AMH u otras moléculas inhibitorias [164, 165] es considerado a día de hoy la limitación principal del éxito del retrasplante. Solamente el 35% de los folículos presentes en el injerto sobrevive a la lesión por isquemia-revascularización [166], por lo tanto, sería conveniente mantener los folículos en reposo en la etapa anterior al injerto.

Además de la ausencia de evidencia de efectos negativos en el uso del bisturí como método de decorticación en el tejido ovárico, se observó una disminución de TNF- α en el medio de cultivo, lo que sugiere que la fuerza de raspado que se aplica para la eliminación de la médula no fue la suficiente como para desencadenar efectos no deseados en la respuesta inflamatoria [167]. Esto es de gran importancia, ya que la decorticación mediante bisturí es una técnica ampliamente utilizada en numerosos programas de preservación de la fertilidad.

Aunque el estudio in vitro nos proporcionó datos de gran utilidad, nuestro objetivo era obtener una imagen completa de todo el procedimiento de criopreservación y trasplante de corteza ovárica. Ello se puede dilucidar a partir del estudio in vivo, donde las diferentes técnicas de decorticación y criopreservación se combinaron entre sí antes del trasplante en un modelo de ratón con inmunodeficiencia. Dicho enfoque nos permitió evaluar adecuadamente como los procesos posteriores influyen en la condición final del estroma ovárico y los folículos.

En general, todas las muestras presentaban una disminución de la densidad folicular tras la decorticación, criopreservación y trasplante cuando se comparaban con las muestras en fresco (controles). No obstante, no se

observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los tres diferentes métodos de decorticación entre ellos. Ésta disminución ya se había descrito con anterioridad en casi todos los estudios relativos a la criopreservación de tejido ovárico y el injerto de tejidos animales [49, 168] y humanos [124, 164, 169]. La depleción del pool folicular compromete el potencial de los injertos de tejido ovárico, siendo especialmente notorio en las muestras de M-SF y B-VT, donde la población de folículos primordiales desapareció por completo y por tanto el 100% de la reserva ovárica estaba formada por folículos en crecimiento. Lo que se traduce en que tras tan solo 21 días el potencial del injerto se había consumido. Los grupos S-SF y M-VT parece que mantenían el equilibrio entre las poblaciones en reposo y en crecimiento, de una manera similar a las muestras control no injertadas. Además y sorprendentemente, los injertos tratados mediante B-SF [122, 170] y S-VT[128], (dos técnicas que se utilizan con éxito en la práctica clínica y con nacimientos vivos reportados), presentaron el 100% de los folículos en la etapa quiescente. Este hallazgo no necesariamente significa que los folículos no puedan activarse, crecer y madurar, ya que se ha informado de un periodo de 4,5 meses para la recuperación de la actividad ovárica tras el trasplante en pacientes oncológicas [122, 170, 171], y nuestro xenotrasplante se mantuvo solo durante 21 días. De hecho, la secreción de estradiol fue documentada en todos los animales trasplantados con tejido ovárico y en todos los grupos, lo que demuestra que los folículos secundarios se encontraban presentes, bien conservados y en injertos viables [172, 173].

Por lo tanto, debemos ser cautelosos con respecto a la ausencia de folículos primordiales o en crecimiento basándonos en el examen histológico ya que tanto el número reducidos de folículos como su distribución heterogénea son unas características importantes del tejido ovárico humano en comparación con tejido ovárico de roedores o bovinos [122, 174]. La evaluación histológica de los fragmentos ováricos proporciona información útil y valiosa pero también presenta ciertas limitaciones ya que no te permite obtener el mapa completo de la composición folicular y por ello se requieren estudios

con parámetros complementarios. Aun así, la evaluación histológica se considera la técnica *gold standard* para la valoración de la reserva ovárica en estudios experimentales.

El mantenimiento de la función endocrina es una de las principales ventajas de la criopreservación de tejido ovárico en comparación con la vitrificación de ovocitos, y nuestros resultados revelan que todas las muestras (incluidas todas las muestras decorticadas por los tres sistemas y criopreservadas tanto por vitrificación como por congelación lenta) eran capaces de recuperar la actividad endocrina, lo que se manifestaba a través de la producción de estradiol. Aunque no se realizaron estudios comparativos entre los diferentes métodos porque el análisis de sangre se realizó en el momento del sacrificio del animal (independientemente de la fase del ciclo ovárico) para mantener el mismo periodo de injerto en todas las muestras. Los injertos criopreservados mediante congelación lenta parecían mejorar la función endocrina con respecto a los criopreservados mediante vitrificación en términos de producción de estradiol, similar a lo observado por otros estudios [175].

En contrapunto, cuando se examinó el estroma ovárico observamos en rasgos generales que las muestras sometidas a vitrificación presentaban en el injerto una mayor vascularización y una reducción de la fibrosis, aunque la proliferación no se encontraba afectada. Estos hallazgos están en consonancia con estudios previos que mostraban que gracias a la vitrificación se preservaba mejor el estroma, las células de la granulosa y los vasos sanguíneos [124, 125, 176-178] en comparación con la congelación lenta, (la cual preservaba peor el estroma y el endotelio vascular). Es notorio también la tendencia de las muestras decorticadas mediante microtijera quirúrgica y mediante slicer (con probada inhibición de la ruta Hippo) a mostrar valores más altos de MVD en ambos métodos de criopreservación. Este hallazgo se podría explicar en parte por la proliferación de células endoteliales inducida a su vez por la alteración de la ruta Hippo.

La evaluación de la fibrosis sugiere que el método de decorticación puede ser clave en el resultado final, particularmente importante para las muestras tratadas mediante microtijera quirúrgica y bisturí, donde la fibrosis se encontraba significativamente aumentada en comparación con las muestras tratadas mediante slicer, independientemente del sistema de criopreservación utilizado. En general, el estroma ovárico parece encontrarse mejor conservado en los injertos sometidos al grupo del slicer.

Como hemos resaltado anteriormente uno de los factores limitantes más importantes en el éxito de la criopreservación de corteza ovárica tiene lugar tras el trasplante; durante los primeros días se produce una pérdida folicular de aproximadamente un 60% [179]. Debido a ello se están investigando nuevas estrategias que permitan mejorar la tasa de supervivencia folicular. Un enfoque que podría resultar en la mejora de la revascularización sería el uso de factores antiapoptóticos y antiangiogénicos tales como la esfingosina-1- fosfato [180] que parece reducir la necrosis y la hipoxia y promueve la angiogénesis. Otros factores que parecen influir de manera positiva son tanto el uso de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular). Ambos parece que mejoran la tasa de recuperación de folículos primordiales y folículos secundarios en el tejido trasplantado [181]. Así mismo el ácido hialurónico que contenga bFGF y VEGF parece también disminuir la apoptosis [182].

Por todo ello y basándonos en nuestros resultados, no podemos concluir que exista un sistema universal y perfecto para procesar, criopreservar y trasplantar la corteza ovárica. No obstante, nuestro estudio recalca el hecho de que cada paso es importante, también y especialmente la preparación del tejido ovárico para los siguientes procedimientos. Esto ya lo sugirió previamente Gavish et al [49], el cual determinó que el grosor de los fragmentos era determinante para el xenotrasplante. En la literatura se esperaba que cuanto más delgado fuera el fragmento mejor sería ya que aseguraría la penetración del agente crioprotector y por tanto la

preservación del folículo. En vez de esto se encontró que los injertos delgados presentaban una menor dotación folicular debido a la depleción y agotamiento folicular y tampoco mostraron mejoras significativas en la vascularización y proliferación del injerto en comparación con muestras más gruesas. Nuestros resultados también revelaron la importancia de este fenómeno de depleción en el agotamiento folicular, pero se sugiere que este proceso más que en el trasplante se inicia durante la decorticación del tejido. Además, la criopreservación y trasplante presentaron otros y cruciales cambios en la corteza ovárica que se añadirían a los efectos provocados por la decorticación.

7. Conclusiones

- La decorticación ovárica mediante microtijera y bisturí inducen un grado mayor de daño celular y una peor preservación del estroma.
- Pese a provocar una activación folicular con aumento de expresión de los genes de la ruta Hippo, la decorticación ovárica mediante slicer parece ser el método menos deletéreo para el estroma, ya que se produce una menor fibrosis y parece mejorar la vascularización.
- Dichos hallazgos pueden ser aplicables a la práctica clínica para intentar mejorar los resultados del trasplante de tejido ovárico.
- La decorticación, crioconservación y xenotrasplante de tejido ovárico disminuye la densidad folicular independientemente de los métodos utilizados.
- La criopreservación de tejido ovárico mediante vitrificación favorece una mejor revascularización.
- No podemos concluir que exista un sistema universal y perfecto para procesar, criopreservar y trasplantar la corteza ovárica.

8. Bibliografía

1. Keith L. Moore, T.V.N.P., *EMBRIOLOGIA CLINICA*. ELSEVIER ESPAÑA, 2008. **8º edición.**
2. Frank H. Netter, M., *Atlas de Anatomía Humana*. Elsevier Masson, 2007. **4º edición.**
3. Sobotta, J., *Atlas de Anatomía humana. Sobotta*. PANAMERICANA, 2006. **2. Tronco abdomen y miembro inferior.**
4. Ross, P., *Histología. Texto y Atlas a color con Biología Celular y Molecular*. . Editorial Médica Panamericana, 2007. **5º edición.**
5. Jones, G.S., *Luteal phase defect: a review of pathophysiology*. Curr Opin Obstet Gynecol, 1991. **3(5)**: p. 641-8.
6. Jesús AF Tresguerres, C.C., in *Lagman, embriología medica : con orientación clínica*, T.W. Sadler, Editor. p. 1007-1023.
7. Gorbsky, T.P.a.G.J., *The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis*. Biology, 2017.
8. Block, E., *Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; methods of quantitative determinations*. Acta Anat (Basel), 1951. **12(3)**: p. 267-85.
9. te Velde, E.R. and P.L. Pearson, *The variability of female reproductive ageing*. Hum Reprod Update, 2002. **8(2)**: p. 141-54.
10. Pelosi, E., A. Forabosco, and D. Schlessinger, *Genetics of the ovarian reserve*. Front Genet, 2015. **6**: p. 308.
11. Wallace, W.H. and T.W. Kelsey, *Human ovarian reserve from conception to the menopause*. PLoS One, 2010. **5(1)**: p. e8772.
12. Gougeon, A., *Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results*. Hum Reprod, 1986. **1(2)**: p. 81-7.
13. Gougeon, A., *Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles*. Maturitas, 1998. **30(2)**: p. 137-42.
14. TG, B., *A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries*. Proc.R.Soc.London, Ser, 1963: p. 417-433.
15. Gougeon, A. and G.B. Chainy, *Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages*. J Reprod Fertil, 1987. **81(2)**: p. 433-42.
16. McNatty, K.P., et al., *Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. **56(5)**: p. 1022-31.
17. Mc Natty, K.P.H., S.G., Vanden Boogaard , A.M.J., Tromboskemper, T.C.M. Reichert, L.E. and Van Hall, E.V., *Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle*. J. Clinic. Endocrinol. Metab., 1983: p. 1022-1031.
18. Gougeon, A. and B. Lefevre, *Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle*. J Reprod Fertil, 1983. **69(2)**: p. 497-502.
19. JS, R., *Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation*. Physiol. Rev, 1980: p. 51-89.
20. McNatty, K.P., *Ovarian follicular development from the onset of luteal regression in humans and sheep*. 1982.

21. Bomsel-Helmreich O., G.A., Thébault A., Saltarelli D., Milgrom E., Frydman R. and Papiernik E., *Healthy and atretic human follicles in the pre-ovulatory phase: differences in evolution of follicular morphology and steroid content of follicular fluid*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1979; p. 686-694.
22. diZerega, G.S. and G.D. Hodgen, *Fluorescence localization of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin uptake in the primate ovary. II. Changing distribution during selection of the dominant follicle*. J Clin Endocrinol Metab, 1980. **51**(4): p. 903-7.
23. Roura, S.E.d.G.y.O.L.C., *Tratado de Ginecología y Obstetricia. Ginecología y Medicina de la Reproducción*. 2013. **Capítulo 24. Fisiología femenina I: ciclo ovárico.**: p. 214-221.
24. *Cáncer. Nota descriptiva N°297*. Febrero 2015.
25. *Informe mundial sobre el cancer*. IARC.
26. Bray, F., et al., *Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. Int J Cancer, 2013. **132**(5): p. 1133-45.
27. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
28. Cáncer, R.E.d.R.d., *Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa*. REDECAN, Octubre 2014.
29. OMS, *Nota descriptiva N°334*. Salud de la mujer, 2013.
30. RETI-SEHOP, I. 2014.
31. Howlader N, N.A., Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011*. National Cancer Institute. Bethesda, MD, April 2014.
32. Peris Bonet R, F.G.S., Valero Poveda S, Pardo Romaguera E., *Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2014. Registro Español de Tumores infantiles. Editado por Universidad de Valencia*. 2015.
33. Meiorow, D., *Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **169**(1-2): p. 123-31.
34. Larsen, E.C., et al., *Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(11): p. 5307-14.
35. Indiano JM, M.A., *Efectos secundarios tardíos y segundas neoplasias*. Hematología y Oncología Pediátricas, 2005.
36. Anderson, R.A., et al., *Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(7): p. 556-67.
37. Andres, M.M. and V. Castel, *[Preservation of fertility in children and adolescents with cancer: current situation and future perspectives]*. An Pediatr (Barc), 2009. **71**(5): p. 440-6.
38. Pediátricas, G.d.t.s.e.s.a.l.p.y.s.t.d.l.S.E.d.H.y.O., *Efectos tardíos en supervivientes de un cáncer en la infancia*. 2012.
39. Oeffinger Kc, N.P., Leontien MS, Kremer CM, *Challenges after curative treatment for childhood cancer and long-term follow up of survivors*. Pediatr Clin N Am, 2008: p. 251-73.

40. Lanzkowsky P, R.A., *Evaluation, investigations and management of late effects of childhood cancer*. Manual of Pediatric. Hematology and Oncology, 2005: p. 749-74.
41. C., C.E., *Efecos tardios del tratamiento del niño con cáncer*. An Pediatr Contin, 2006.
42. Martinez, F., Devesa, M., Coroleu, B., Tur, R., Gonzalez, C., Boada, M., Sole, M., Veiga, A., and Barri, P.N, *Cancer and fertility preservation: Barcelona consensus meeting*. Gynecol Endocrinol, 2013. **29**: p. 285-291.
43. Hudson, M.M., et al., *High-risk populations identified in Childhood Cancer Survivor Study investigations: implications for risk-based surveillance*. J Clin Oncol, 2009. **27**(14): p. 2405-14.
44. Gonzalez, *Protocolos de vigilancia sanitaria específica: Agentes citostáticos*. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003.
45. Meiorow, D., et al., *Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction*. Clin Obstet Gynecol, 2010. **53**(4): p. 727-39.
46. Oktem, O. and K. Oktay, *A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve*. Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10159-62.
47. Meiorow, D., et al., *Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury*. Hum Reprod, 2007. **22**(6): p. 1626-33.
48. Novella-Maestre, E., et al., *Short-Term PTEN Inhibition Improves In Vitro Activation of Primordial Follicles, Preserves Follicular Viability, and Restores AMH Levels in Cryopreserved Ovarian Tissue From Cancer Patients*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0127786.
49. Gavish, Z., et al., *Follicle activation and 'burn-out' contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness*. Hum Reprod, 2014. **29**(5): p. 989-96.
50. Kalich-Philosoph, L., et al., *Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility*. Sci Transl Med, 2013. **5**(185): p. 185ra62.
51. Perez, G.I., et al., *Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells*. Biol Reprod, 2000. **63**(5): p. 1358-69.
52. Morgan, S., et al., *How do chemotherapeutic agents damage the ovary?* Hum Reprod Update, 2012. **18**(5): p. 525-35.
53. Lara, R., C. Carmen, and S. Sabine, *Fertility considerations and the pediatric oncology patient*. Semin Pediatr Surg, 2016. **25**(5): p. 318-322.
54. Meiorow, D. and D. Nugent, *The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(6): p. 535-43.
55. Wallace, W.H., A.B. Thomson, and T.W. Kelsey, *The radiosensitivity of the human oocyte*. Hum Reprod, 2003. **18**(1): p. 117-21.
56. Stroud, J.S., et al., *Effects of cancer treatment on ovarian function*. Fertil Steril, 2009. **92**(2): p. 417-27.
57. Duncan, F.E., B.F. Kimler, and S.M. Briley, *Combating radiation therapy-induced damage to the ovarian environment*. Future Oncol, 2016. **12**(14): p. 1687-90.

58. Critchley, H.O. and W.H. Wallace, *Impact of cancer treatment on uterine function*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2005(34): p. 64-8.
59. Critchley, H.O., et al., *Abdominal irradiation in childhood; the potential for pregnancy*. Br J Obstet Gynaecol, 1992. **99**(5): p. 392-4.
60. Eurostat, *Women in the EU gave birth to their first child at almost 29 years of age on average*. 85/2015, May 2015.
61. Simon, B., et al., *Preserving fertility after cancer*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(4): p. 211-28; quiz 263-4.
62. Donnez, J., et al., *Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2000. **12**(1): p. 1-9.
63. Poniatowski, B.C., P. Grimm, and G. Cohen, *Chemotherapy-induced menopause: a literature review*. Cancer Invest, 2001. **19**(6): p. 641-8.
64. De Vos, M., P. Devroey, and B.C. Fauser, *Primary ovarian insufficiency*. Lancet, 2010. **376**(9744): p. 911-21.
65. Group, P.G.D., *Management of women with premature ovarian insufficiency*. Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology, December 2015.
66. Wallace, W.H., Thomson, A.B., and Kelsey, T.W., *The radiosensitivity of the human oocyte*. Hum Reprod, 2003: p. 117-121.
67. Gargus, E., et al., *Management of Primary Ovarian Insufficiency Symptoms in Survivors of Childhood and Adolescent Cancer*. J Natl Compr Canc Netw, 2018. **16**(9): p. 1137-1149.
68. Britton, L., *Unintended Pregnancy: A Systematic Review of Contraception Use and Counseling in Women With Cancer*. Clin J Oncol Nurs, 2017. **21**(2): p. 189-196.
69. Maltaris, T., et al., *Cancer and fertility preservation: fertility preservation in breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(2): p. 206.
70. Nielsen SN, A.A., Schmidt KT, Rechnitzer C, Schmiegelow K, Bentzen JG, Larsen EC, *A 10-year follow up of reproductive function in women treated for childhood cancer*. Reprod Biomed Online, 2013. **27**. vol 2: p. 192-200.
71. Visser, J.A., et al., *Anti-Mullerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(6): p. 331-41.
72. Iwase, A., et al., *Anti-Mullerian hormone as a marker of ovarian reserve: What have we learned, and what should we know?* Reprod Med Biol, 2016. **15**(3): p. 127-136.
73. Dama, E., et al., *Life after childhood cancer: marriage and offspring in adult long-term survivors--a population-based study in the Piedmont region, Italy*. Eur J Cancer Prev, 2009. **18**(6): p. 425-30.
74. Madanat, L.M., et al., *Probability of parenthood after early onset cancer: a population-based study*. Int J Cancer, 2008. **123**(12): p. 2891-8.
75. Donnez, J. and M.M. Dolmans, *Fertility preservation in women*. Nat Rev Endocrinol, 2013. **9**(12): p. 735-49.
76. Oktay, K., et al., *Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue*. Fertil Steril, 1997. **67**(3): p. 481-6.
77. Lambertini, M., et al., *Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists During Chemotherapy for Preservation of Ovarian Function and Fertility in Premenopausal Patients With Early Breast Cancer: A Systematic Review and*

- Meta-Analysis of Individual Patient-Level Data*. J Clin Oncol, 2018: p. Jco2018780858.
78. Senra, J.C. and M. Roque, *Gonadotropin-releasing hormone agonists for ovarian protection during cancer chemotherapy: systematic review and meta-analysis*. 2018. **51**(1): p. 77-86.
 79. Moore, H.C.F., et al., *Final Analysis of the Prevention of Early Menopause Study (POEMS)/SWOG Intergroup S0230*. J Natl Cancer Inst, 2018.
 80. Ray, G.R., et al., *Oophoropexy: a means of preserving ovarian function following pelvic megavoltage radiotherapy for Hodgkin's disease*. Radiology, 1970. **96**(1): p. 175-80.
 81. Gomez-Hidalgo, N.R., et al., *Ovarian torsion after laparoscopic ovarian transposition in patients with gynecologic cancer: a report of two cases*. J Minim Invasive Gynecol, 2015. **22**(4): p. 687-90.
 82. Moawad, N.S., et al., *Laparoscopic Ovarian Transposition Before Pelvic Cancer Treatment: Ovarian Function and Fertility Preservation*. J Minim Invasive Gynecol, 2017. **24**(1): p. 28-35.
 83. Rienzi, L., et al., *Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance*. Hum Reprod Update, 2017. **23**(2): p. 139-155.
 84. Trounson, A. and L. Mohr, *Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo*. Nature, 1983. **305**(5936): p. 707-9.
 85. Edgar, D.H. and D.A. Gook, *A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos*. Hum Reprod Update, 2012. **18**(5): p. 536-54.
 86. Cobo, A., et al., *Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles*. Fertil Steril, 2012. **98**(5): p. 1138-46.e1.
 87. Mukaida, T., et al., *Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique*. Fertil Steril, 2001. **76**(3): p. 618-20.
 88. Liebermann, J. and M.J. Tucker, *Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification*. Reproduction, 2002. **124**(4): p. 483-9.
 89. Kuwayama, M., *Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method*. Theriogenology, 2007. **67**(1): p. 73-80.
 90. Senn, A., et al., *Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage*. Fertil Steril, 2000. **74**(5): p. 946-52.
 91. Son, W.Y., et al., *Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele*. Hum Reprod, 2003. **18**(1): p. 137-9.
 92. Shapiro, B.S., et al., *Similar ongoing pregnancy rates after blastocyst transfer in fresh donor cycles and autologous cycles using cryopreserved bipronuclear*

- oocytes suggest similar viability of transferred blastocysts.* Fertil Steril, 2010. **93**(1): p. 319-21.
93. Loren, A.W., et al., *Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update.* J Clin Oncol, 2013. **31**(19): p. 2500-10.
 94. Dondorp, W., et al., *Oocyte cryopreservation for age-related fertility loss.* Hum Reprod, 2012. **27**(5): p. 1231-7.
 95. Hutt, K.J. and D.F. Albertini, *An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis.* Reprod Biomed Online, 2007. **14**(6): p. 758-64.
 96. Son, W.Y., et al., *Immature Oocyte for Fertility Preservation.* Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 464.
 97. Goud, A., et al., *Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions.* Fertil Steril, 2000. **74**(3): p. 487-94.
 98. Wu, J., L. Zhang, and X. Wang, *In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes.* Reproduction, 2001. **121**(3): p. 389-93.
 99. Park, S.E., et al., *Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage.* Fertil Steril, 1997. **68**(5): p. 920-6.
 100. Albuz, F.K., et al., *Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes.* Hum Reprod, 2010. **25**(12): p. 2999-3011.
 101. Nogueira, D., et al., *Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development.* Biol Reprod, 2006. **74**(1): p. 177-84.
 102. Shu, Y.M., et al., *Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes.* Hum Reprod, 2008. **23**(3): p. 504-13.
 103. Vanhoutte, L., D. Nogueira, and P. De Sutter, *Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental competence.* Hum Reprod, 2009. **24**(3): p. 658-69.
 104. Vanhoutte, L., et al., *Assessment of a new in vitro maturation system for mouse and human cumulus-enclosed oocytes: three-dimensional prematuration culture in the presence of a phosphodiesterase 3-inhibitor.* Hum Reprod, 2009. **24**(8): p. 1946-59.
 105. Cobo, A., et al., *Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation.* Fertil Steril, 2016. **105**(3): p. 755-764.e8.
 106. von Wolff, M., et al., *Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase.* Fertil Steril, 2009. **92**(4): p. 1360-5.
 107. Sonmezer, M. and K. Oktay, *Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy.* Oncologist, 2006. **11**(5): p. 422-34.
 108. Oktay, K., et al., *Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation.* J Clin Oncol, 2005. **23**(19): p. 4347-53.

109. Azim, A.A., M. Costantini-Ferrando, and K. Oktay, *Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(16): p. 2630-5.
110. Cobo, A., et al., *Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method*. Fertil Steril, 2008. **89**(6): p. 1657-64.
111. Kuwayama, M., et al., *Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes*. Reprod Biomed Online, 2005. **11**(3): p. 300-8.
112. De Vos, M., J. Smits, and T.K. Woodruff, *Fertility preservation in women with cancer*. Lancet, 2014. **384**(9950): p. 1302-10.
113. *Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion*. Fertil Steril, 2013. **100**(5): p. 1214-23.
114. Shaw, J.M., et al., *Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients*. Hum Reprod, 1996. **11**(8): p. 1668-73.
115. Donnez, J. and M.M. Dolmans, *Fertility Preservation in Women*. N Engl J Med, 2018. **378**(4): p. 400-401.
116. Donnez, J., et al., *Fertility preservation for age-related fertility decline*. Lancet, 2015. **385**(9967): p. 506-7.
117. Demeestere, I., et al., *Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood*. Hum Reprod, 2015. **30**(9): p. 2107-9.
118. Rodriguez-Wallberg, K.A., et al., *Ovarian tissue cryopreservation and transplantation among alternatives for fertility preservation in the Nordic countries - compilation of 20 years of multicenter experience*. 2016. **95**(9): p. 1015-26.
119. Van der Ven, H., et al., *Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates*. Hum Reprod, 2016. **31**(9): p. 2031-41.
120. Stoop, D., S. Silber, and A. Cobo, *Fertility preservation for age-related fertility decline - authors' reply*. Lancet, 2015. **385**(9967): p. 507-8.
121. Donnez, J., et al., *Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue*. Lancet, 2004. **364**(9443): p. 1405-10.
122. Diaz-Garcia, C., et al., *Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study*. Fertil Steril, 2018. **109**(3): p. 478-485.e2.
123. Donnez, J., J. Squifflet, and M.M. Dolmans, *Frozen-thawed ovarian tissue retransplants*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(6): p. 472-8.
124. Herraiz, S., et al., *Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices*. Fertil Steril, 2014. **101**(3): p. 775-84.
125. Keros, V., et al., *Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue*. Hum Reprod, 2009. **24**(7): p. 1670-83.

126. Kagawa, N., S. Silber, and M. Kuwayama, *Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue*. *Reprod Biomed Online*, 2009. **18**(4): p. 568-77.
127. Silber, S., et al., *Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation*. *Fertil Steril*, 2010. **94**(6): p. 2191-6.
128. Silber, S.J., et al., *Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA*. *J Assist Reprod Genet*, 2018.
129. Sanchez, M., et al., *The Valencia Programme for Fertility Preservation*. *Clin Transl Oncol*, 2008. **10**(7): p. 433-8.
130. von Wolff, M., et al., *Fertility preservation in women--a practical guide to preservation techniques and therapeutic strategies in breast cancer, Hodgkin's lymphoma and borderline ovarian tumours by the fertility preservation network FertiPROTEKT*. *Arch Gynecol Obstet*, 2011. **284**(2): p. 427-35.
131. Isachenko, V., et al., *Cryobanking of human ovarian tissue for anti-cancer treatment: comparison of vitrification and conventional freezing*. *Cryo Letters*, 2009. **30**(6): p. 449-54.
132. Andersen, C.Y., et al., *Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue*. *Hum Reprod*, 2008. **23**(10): p. 2266-72.
133. Gosden, R.G., et al., *Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C*. *Hum Reprod*, 1994. **9**(4): p. 597-603.
134. Courbiere, B., et al., *Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols*. *Fertil Steril*, 2006. **86**(4 Suppl): p. 1243-51.
135. Amorim, C.A., et al., *Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation*. *J Assist Reprod Genet*, 2011. **28**(12): p. 1157-65.
136. Suzuki, N., et al., *Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency*. *Hum Reprod*, 2015. **30**(3): p. 608-15.
137. Silber, S.J., *Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation*. *Mol Hum Reprod*, 2012. **18**(2): p. 59-67.
138. Newton, H., et al., *Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue*. *Hum Reprod*, 1996. **11**(7): p. 1487-91.
139. Fransolet, M., et al., *Influence of mouse strain on ovarian tissue recovery after engraftment with angiogenic factor*. *J Ovarian Res*, 2015. **8**: p. 14.
140. Hormozi, M., et al., *The effect of Setarud (IMOD(TM)) on angiogenesis in transplanted human ovarian tissue to nude mice*. *Iran J Reprod Med*, 2015. **13**(10): p. 605-14.
141. Dath, C., et al., *Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells*. *Hum Reprod*, 2011. **26**(6): p. 1431-9.
142. Amorim, C.A., et al., *Successful vitrification and autografting of baboon (Papio anubis) ovarian tissue*. *Hum Reprod*, 2013. **28**(8): p. 2146-56.
143. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. *Genome Res*, 1996. **6**(10): p. 986-94.
144. <http://www.rt-pcr.com>, *Imagen extraída*.

145. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
146. Fleming, J.M., et al., *Local regulation of human breast xenograft models*. *J Cell Physiol*, 2010. **224**(3): p. 795-806.
147. Sanchez-Serrano, M., et al., *Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification*. *Fertil Steril*, 2010. **93**(1): p. 268.e11-3.
148. Chemical, C., *Estradiol ELISA Kit*.
149. Forman, E.J., *Ovarian tissue cryopreservation: still experimental?* *Fertil Steril*, 2018. **109**(3): p. 443-444.
150. Feder, M.E. and G.E. Hofmann, *Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology*. *Annu Rev Physiol*, 1999. **61**: p. 243-82.
151. Noble, E.G. and G.X. Shen, *Impact of exercise and metabolic disorders on heat shock proteins and vascular inflammation*. *Autoimmune Dis*, 2012. **2012**: p. 836519.
152. Radons, J. and G. Multhoff, *Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70*. *Exerc Immunol Rev*, 2005. **11**: p. 17-33.
153. Barreno, P.G., *Inflamación*. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 2008. **102**(1): p. 91-159.
154. Pellicer, B., et al., *Ultrasound bioeffects in rats: quantification of cellular damage in the fetal liver after pulsed Doppler imaging*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2011. **37**(6): p. 643-8.
155. Salvesen, G.S. and V.M. Dixit, *Caspases: intracellular signaling by proteolysis*. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 443-6.
156. Zhivotovsky, B., et al., *Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **230**(3): p. 481-8.
157. Mohan, C., et al., *Detection of end-stage apoptosis by ApopTag(R) TUNEL technique*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1219**: p. 43-56.
158. Luo, M., et al., *Unrepaired DNA damage in macrophages causes elevation of particulate matter- induced airway inflammatory response*. *Aging (Albany NY)*, 2018. **10**(4): p. 549-560.
159. Bergqvist, A., et al., *Interleukin 1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in endometriotic tissue and in endometrium*. *Fertil Steril*, 2001. **75**(3): p. 489-95.
160. Pan, D., *Hippo signaling in organ size control*. *Genes Dev*, 2007. **21**(8): p. 886-97.
161. Holbourn, K.P., K.R. Acharya, and B. Perbal, *The CCN family of proteins: structure-function relationships*. *Trends Biochem Sci*, 2008. **33**(10): p. 461-73.
162. Kawamura, K., et al., *Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(43): p. 17474-9.
163. Roness, H., et al., *Ovarian follicle burnout: a universal phenomenon?* *Cell Cycle*, 2013. **12**(20): p. 3245-6.
164. Fortune, J.E., et al., *The primordial to primary follicle transition*. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. **163**(1-2): p. 53-60.

165. Martinez-Madrid, B., et al., *Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle*. Fertil Steril, 2007. **87**(5): p. 1153-65.
166. Greenwald, G.S., *Of eggs and follicles*. Am J Anat, 1972. **135**(1): p. 1-3.
167. Ayuandari, S., et al., *Follicular growth after xenotransplantation of cryopreserved/thawed human ovarian tissue in SCID mice: dynamics and molecular aspects*. J Assist Reprod Genet, 2016.
168. Silber, S., *Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications*. J Assist Reprod Genet, 2016. **33**(12): p. 1595-1603.
169. Baird, D.T., et al., *Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C*. Endocrinology, 1999. **140**(1): p. 462-71.
170. Arias, J.I., M.A. Aller, and J. Arias, *Surgical inflammation: a pathophysiological rainbow*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 19.
171. Gavish, Z., M. Ben-Haim, and A. Arav, *Cryopreservation of whole murine and porcine livers*. Rejuvenation Res, 2008. **11**(4): p. 765-72.
172. Gavish, Z., et al., *Follicle activation is a significant and immediate cause of follicle loss after ovarian tissue transplantation*. 2018. **35**(1): p. 61-69.
173. Donnez, J. and M.M. Dolmans, *Fertility Preservation in Women*. N Engl J Med, 2017. **377**(17): p. 1657-1665.
174. Donnez, J., et al., *Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation*. Fertil Steril, 2013. **99**(6): p. 1503-13.
175. Sanyal, M.K., et al., *Development of graafian follicles in adult human ovary. I. Correlation of estrogen and progesterone concentration in antral fluid with growth of follicles*. J Clin Endocrinol Metab, 1974. **38**(5): p. 828-35.
176. Fowler, R.E., et al., *Steroid production from 17alpha-hydroxypregnenolone and dehydroepiandrosterone by human granulosa cells in vitro*. J Reprod Fertil, 1978. **54**(1): p. 109-17.
177. Schmidt, K.L., et al., *Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries*. Hum Reprod, 2003. **18**(6): p. 1158-64.
178. Nikiforov, D., et al., *Innovative multi-protectoral approach increases survival rate after vitrification of ovarian tissue and isolated follicles with improved results in comparison with conventional method*. J Ovarian Res, 2018. **11**(1): p. 65.
179. Dolmans, M.M., et al., *Impact of the cryopreservation technique and vascular bed on ovarian tissue transplantation in cynomolgus monkeys*. J Assist Reprod Genet, 2015. **32**(8): p. 1251-62.
180. Sheikhi, M., et al., *Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue*. Hum Reprod, 2011. **26**(3): p. 594-603.
181. Mazoochi, T., et al., *Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue*. Fertil Steril, 2008. **90**(4 Suppl): p. 1480-6.
182. Dolmans, M.M. and D.D. Manavella, *Recent advances in fertility preservation*. J Obstet Gynaecol Res, 2018.

183. Soleimani, R., E. Heytens, and K. Oktay, *Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19475.
184. Gao, J., et al., *Effect of Local Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor on Subcutaneously Allografted Ovarian Tissue in Ovariectomized Mice*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134035.
185. Tavana, S., et al., *Restoration of ovarian tissue function and estrous cycle in rat after autotransplantation using hyaluronic acid hydrogel scaffold containing VEGF and bFGF*. Growth Factors, 2016. **34**(3-4): p. 97-106.

9. Apéndice documental

Los resultados de la presente tesis doctoral han sido aceptados para su publicación en la revista científica *Fertility and Sterility*.

Optimizing ovarian tissue quality before cryopreservation: Comparing outcomes of three decortication methods on stromal and follicular viability.

Sonia Herraiz Ph.D.^{a,b,¥}, Susana Monzó M.D.^{c,¥}, Belén Gómez-Giménez Ph.D.^b, Antonio Pellicer M.D.^{a,b,d}, César Díaz-García M.D.^{b,c,*}

- a. IVI Foundation, 46026 Valencia, Spain.
- b. Reproductive Medicine Research Group, IIS La Fe, 46026 Valencia, Spain.
- c. Fertility Preservation Unit, Women's Health Area, La Fe University Hospital, 46026 Valencia, Spain.
- d. IVI-RMA Rome, 00197 Rome, Italy.
- e. IVI-London, W1G 9RQ London, UK.

¥ These authors should be considered similar in author order.

*Corresponding author:

Dr. César Díaz-García M.D., Ph.D.

IVI-London; 83 Wimpole St, Marylebone, London W1G 9RQ, UK

Phone num: +44 20 7078 4868

e-mail: Cesar.Diaz@ivirma.com

Study funding: Funded by Fundación Dexeus Salud de la Mujer (2013), by the Regional Valencian Ministry of Education (PROMETEO/2018/137) and by the Spanish

Ministry of Economy and Competitiveness (PI16/FIS PI16/01664 and PTQ-16-08222 for S.H. participation).

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests.

Capsule

Decortication of ovarian tissue employing a slicer preserves follicles and stroma causing less damage than other commonly-used methods but inhibits the Hippo pathway compromising balance in follicular activation

ABSTRACT

Objective: To evaluate if specific ovarian decortication techniques vary in promoting ovarian cortex cryopreservation and transplant outcomes.

Design: Experimental design.

Setting: University Hospital

Patients/Animals: NOD/SCID female mice.

Intervention: Human ovarian biopsies were allocated to one of the following decortication procedures: scratching with scalpel blade (B), cutting with microsurgical scissors (M), separation with slicer (S) or no-separation (control, C). In a parallel *in vivo* experiment, decortication techniques were combined with slow-freezing (SF) and vitrification (VT) before xenograft into immunodeficient mice.

Main outcome measures: follicular counts, apoptosis, shear stress, Hippo pathway and inflammation. For the *in vivo*, recovered grafts were analyzed for follicular counts, angiogenesis, proliferation and fibrosis.

Results: There were no differences in follicular density or number of damaged follicles between decortication techniques in the *in vitro* study. Nevertheless, M-samples showed

significantly increased stromal damage compared to controls and S-samples ($p=0.022$ and $p=0.041$) and up-regulation of Hsp60 shear stress gene expression. Decortication by both M and S inhibited the Hippo pathway promoting gene expression changes.

After 21-day xenograft, total follicular density significantly decreased compared to non-grafted controls in all groups. Nevertheless, no differences were observed between decortication techniques.

Ovarian stroma vascularization was increased in vitrified samples, but among slow-freezing, B-samples had the lowest microvessel density. M-decorticated xenografts had increased fibrosis.

Conclusion: Decortication with slicer causes less damage to ovarian tissue than other commonly-used methods although microsurgical scissors seems to preserve slightly increased follicular numbers. Nevertheless, Blade-decortication seems to be a reliable technique maintaining acceptable follicular conditions without inducing serious stromal impairment.

Key words: decortication of ovarian tissue, follicle and stroma viability, fertility preservation, ovarian cortex cryopreservation and transplant.

INTRODUCTION

The long-term consequences of cancer treatment in young women include premature ovarian failure and loss of fertility, particularly in patients who receive chemotherapy with alkylating agents and/or pelvic radiotherapy [33, 34, 183]. Addressing this loss of fertility is key; despite any negative consequences to fertility these treatments have rendered, disease-free-5-year survival rates have increased to 84% in women with cancer younger than 45 years [31]. Cryopreservation of the ovarian cortex may be the only available option to preserve fertility in prepubertal girls or patients who need immediate chemotherapy (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2014). To date, more than 130 children have been born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue, but a standardized universal clinical protocol for ovarian tissue cryopreservation and transplant has not been established [170, 184].

Although slow freezing (SF) is still considered the elective technique in clinical practice [185, 186], it has been associated with negative effects on granulosa and theca cell integrity as well as on the ovarian stroma [135, 187]. Furthermore, the number of laboratories and clinics where the technique can be performed is limited due to the required expensive equipment and the time-intensive nature of the procedure.

The vitrification (VT) method has been proposed as a faster and easier alternative to avoid these issues. Despite encouraging results, initial studies have come to highly variable conclusions regarding follicular and stromal viability. Differences in experimental conditions may account for this variation: factors such as the ovarian fragment size, type of cryoprotectant agents (CPAs) and cryopreservation device used or the cooling and warming rates have been tested and all of these can potentially impact the final outcome of ovarian tissue cryopreservation [124-126, 177, 188-193].

Most studies performed to improve cryopreservation protocols have focused on one parameter at a time in the cryopreservation technique. However, the effects of the preceding tissue preparation steps or the transplant technique have not been systematically assessed.

Ovarian tissue decortication is a critical initial step in any ovarian tissue preservation technique. Decortication is the removal of the remaining medulla to improve CPA infiltration into the ovarian cortex. To date, three different decortication methods have been described: scratching with a scalpel blade [124, 129, 194], cutting with microsurgical scissors [195], and separation by a slicer [126]. There are no previous studies comparing these ovarian decortication methods, and the literature suggests that ovarian graft thickness could compromise follicular dynamics after reimplantation [49]. We hypothesize that different decortication methods induce shear stresses that affect stromal and follicular viability. Therefore, the aim of the present study is to compare the three decortication methods and to evaluate their effects on ovarian graft thickness, follicular activation dynamics and follicle and stroma viability.

MATERIALS AND METHODS

Study design

A multistep study combining *in vitro* and *in vivo* experiments was performed to evaluate the effect of three ovarian decortication techniques in combination with two cryopreservation methods (Supplemental Figure 1).

For the *in vitro* study, three decortication methods were compared: no decortication (control group), scratching with a scalpel blade No-22A (Swann Morton, Sheffield, UK) (experimental group B), cutting with microsurgical scissors (SCD-10, S&T, Neuhausen, Switzerland) (group M), and separation using a slicer (Kitazato Biopharma, Fujinomiya, Japan) (group S). After decortication and culture, follicular density and viability were

measured by TUNEL, inflammation was measured by TNF- α secretion, mechanical stress was measured by *HSP60* relative gene expression, and follicular activation was assessed by inhibition of Hippo pathway signaling, and these measures were quantified and compared with ovarian control samples.

For the *in vivo* study, the combination of these 3 decortication methods and 2 cryopreservation techniques, SF and VT, was tested. Samples were subsequently xenografted into immunodeficient mice to evaluate follicular density, ovarian stroma vascularization, proliferation, fibrosis and the endocrine function of each graft.

Ethical approval

The use of human tissue for this study was approved by the Institutional Review Board of La Fe University Hospital (2013/0377) and all patients signed an informed consent document. The Committee on Animal Research of the University of Valencia approved the animal protocols according with the current welfare guidelines (2014/003/UVEG/019).

Human ovarian tissue samples

For the *in vitro* study, ten ovarian biopsies were obtained from ten women with cancer undergoing unilateral oophorectomy. The mean patient age was 28.6 years (15-34 years old) and diagnoses were: breast cancer, (n = 8); Hodgkin lymphoma (n = 1) and Ewing sarcoma (n = 1). For the *in vivo* study, fourteen ovarian cortex biopsies were retrieved during surgical procedures for benign conditions. The mean patient age was 35.8 years (range of 21-41 years) and clinical procedures were: contralateral ovarian benign cysts (n = 6), myomectomies (n = 3) and bilateral tubal ligation (n = 5).

***In vitro* study**

Ovarian cortex decortication and incubation

After ovarian tissue was harvested, each biopsy (n = 10) was divided into 4 pieces of approximately 0.5 cm x 0.5 cm. Fragments were then randomly allocated to one of the four experimental groups (C, B, M or S) (Figure 1).

To allow apoptotic pathway activation, tissue pieces were incubated after decortication in a 6-well plate (Kitazato, Fujinomiya, Japan) with 0.5 mL HEPES-buffered M199 culture media (Sigma Aldrich, St. Louis, US) for 3 h at 37°C and 5% CO₂. After incubation, each ovarian cortex piece was divided into two fragments. One fragment was fixed in 4% neutral buffered formalin and embedded in paraffin and the other was stored at -80°C. The culture medium was also collected and stored at -80°C.

In vivo study

Experimental groups

After ovarian tissue was harvested, each piece (n=14) was subsequently fragmented into pieces that were randomly allocated into one of the following experimental groups (n=7/group): slow freezing after decortication by scalpel blade (B-SF), microsurgical scissors (M-SF) or slicer (S-SF) or vitrification after decortication by blade (B-VT), microsurgical scissors (M-VT) or slicer (S-VT). One fragment was not decorticated and used as a control (Supplemental Figure 1).

Forty-two 6-week-old previously ovariectomized female NMRI Nu/Nu mice (Harlan Laboratories, Madison, WI, US) were used (n = 7 per group) for xenografting one ovarian strip by mouse during 21 days. Ovarian tissue grafts were recovered and divided in two pieces. One was immediately fixed in neutral-buffered formalin and the other was frozen at -80°C for genomic studies. Plasma was also collected and stored at -80°C for quantification of estradiol.

Assessment of decortication effects in ovarian tissue

Ovarian tissue from the *in vitro* study, after the decortication procedures outlined above, was evaluated for stromal and follicular viability after 3 h of culture. We assessed follicular counts by histology, cell damage by TUNEL, shear stress and Hippo pathway activity by PCR and TNF- α secretion by ELISA. In the *in vivo* experiment, recovered grafts were analyzed for follicular counts, angiogenesis and proliferation by CD31 and Ki-67 immunostaining, fibrosis by Masson trichrome staining and estradiol secretion by ELISA. Cell proliferation was expressed as the proliferation index (percentage of Ki-67-positive cells/total cell number per sample) and micro-vessel density (MVD) was determined as the total CD31-positive area by section. Fibrotic area was established as the total low cell nuclei and high collagen fiber content area by tissue section.

All experimental procedures are provided in Supplemental Methods.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm standard deviation (SD) when normal, or medians and interquartile ranges [IQR] when not exhibiting a normal distribution. The Friedman test, followed by a Wilcoxon post-hoc test, was performed to evaluate the results between groups. P-values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using SPSS 22.0 (IBM España, Madrid, Spain).

RESULTS

***In vitro* experiments**

Histological evaluation and follicular counts.

Ovarian decortication using a scalpel blade (B), microsurgical scissors (M), or a slicer (S) did not appear to result in any morphological signs of cell damage, loss of tissue structure or disaggregation in the ovarian cortex. After culture, recovered fragments did not differ in size (C: 3.4[3.1-4.3] mm, B: 4.0[2.4-4.7] mm, M: 3.7[3.1-5.0] mm, and S:

3.1[3-4.3] mm) but decorticated samples were thinner than the controls (C: 2.3[2.0-3.0] mm, B: 1.9[1.2-2.3] mm, M: 1.7[1.4-2.1] mm, and S: 1.5[1.2-1.6] mm).

The morphology of the stromal cells and follicles was well-preserved in all experimental groups. The percentage of morphologically normal follicles was similar between groups, but the B and S groups exhibited a trend toward an increased number of morphologically-normal follicles (C: 61.8 [21.9-73.9]; B: 73.3 [58.9-90.0]; M: 60.0[40.0-71.8]; S: 76.5[42.4-92.8]). Ooplasm shrinkage and detachment of the basal lamina were the most often observed morphological features in abnormal follicles. Total follicular densities were similar among the groups and when specific subpopulations were examined (Table 1). There were no differences between groups in the number of primordial, primary or secondary follicles. The proportion of quiescent and growing follicles was similar to that of the control group in all experimental groups where the medulla was removed, although a slight increase was observed when microsurgical scissors were used (Table 1).

Apoptosis in follicles and stroma: TUNEL quantification.

Positive TUNEL signal was observed in the follicles and stroma of the assessed tissue samples. Four categories of damage (Type I – Type IV) were established, depending on the amount and localization of the TUNEL-positive signal in the follicles. All analyzed samples contained only Type I and II follicles (Table 2) and none of the 411 examined follicles showed a TUNEL-positive signal in the oocyte. When TUNEL was quantified in the stroma (Table 2), a 7-fold increase of apoptotic area was detected in samples where the medulla was removed with microsurgical scissors (M vs. C, $p = 0.022$) compared to controls. The M group also showed increased stoma cell damage compared to the S samples ($p = 0.04$).

HSP60

Expression of the mechanical stress protein *HSP60* gene was similar to that of the control in B and S samples (Fold change (FC) B: 1.3 ± 3.0 and S: 1.9 ± 2.9) but was up-regulated in the M-treated samples (M: 4.2 ± 8.2).

TNF- α

TNF- α secretion (pg/mL) into the culture media was significantly reduced in the B-group while no differences were detected in the M or S groups (vs C: 9.6 [7.8-10.8]; B: 6.8 [6.7-8.5] $p=0.013$; M: 10.2 [6.4-12.6] and S: 9.1 [7.0-11.9]).

Hippo pathway relative expression

Inhibition of the Hippo pathway and therefore, a significant increase in the relative expression of the key Hippo-related genes *BIRC1*, *BIRC7*, *YAP1* and *CCN2* was observed in the M and S groups. The relative expression of these genes was unchanged in the B group compared to control samples where the ovarian medulla was not removed, showing that decortication using a scalpel blade did not disrupt the pathway (Supplemental Figure 2).

In vivo

Histological evaluation and follicular counts.

The 21-day xenotransplantation procedure reduced the xenograft size, therefore causing reduced follicular numbers compared to non-grafted controls in all cases of decortication. Nevertheless, the remaining follicles showed a well-maintained morphology and no evidence of cell damage (Supplemental Figure 3). When the percentage of morphologically abnormal follicles was established, values ranged from 0 to 3% in all experimental groups with no statistically significant differences observed between xenografted samples, nor when the samples were compared with non-grafted controls.

When total follicular densities (foll./mm³) were compared to the non-grafted controls (C: 3.3[0.7-23.4]), they were reduced in all groups cryopreserved by SF (B-SF: 0.3[0.0-1.0], M-SF: 0.7[0.0-1.2] and S-SF: 0.2[0.0-1.2], $p = 0.04$) and by vitrification (B-VT: 0.2[0.1-2.6], M-VT: 0.4[0.0-1.6] and S-VT: 0.3[0.0-0.6], $p = 0.01$). Nevertheless, when decortication techniques were compared, no statistically significant differences were observed among grafted samples with any used cryopreservation method (Figure 1A). The primordial, primary and secondary follicular densities were also calculated (Table 1). The primordial follicle population was reduced in the M-SF group ($p=0.02$) while the primary follicular population also diminished when the B-SF, S-SF and S-VT xenografted samples were compared with the non-grafted controls ($p = 0.002$, $p = 0.03$ and $p = 0.02$ respectively), but no differences were observed in the other experimental groups. No other differences were detected among the assayed separation techniques when they were compared in conjunction with each cryopreservation procedure.

Ovarian stroma evaluation after xenograft

Ovarian grafts cryopreserved by vitrification showed an increased CD31+ vascularized area (B-VT: 1.5% [0.0-2.1], M-VT: 1.4% [0.5-1.6] and S-VT: 1.3% [0.3-1.8]) compared to decortication combined with SF cryopreservation (B-SF: 0.31% [0-0.9], M-SF: 1.8% [1.2-3.4] and S-SF: 0.5% [0.3-1.5]; $p = 0.0036$). Within samples cryopreserved by slow freezing, both the use of microsurgical scissors and slicer increased Micro vessel density (MVD) compared to using a blade (Figure 1B) ($p = 0.0006$ and $p = 0.03$, respectively). No differences in MVD were observed among vitrified samples regardless of the decortication method used.

No differences in proliferation assessed by Ki67 positivity were detected in any group comparison (Table 3). Fibrosis after xenograft did not differ in those samples where the same decortication technique was used with a different cryoprotection system. The use

of a slicer in SF samples reduced the fibrotic area to 24.1% compared to the 37.7% fibrotic area observed in B-SF samples or the 45.2% area in M-SF samples ($p = 0.009$). The same pattern was observed in the vitrified samples (Figure 1C-D), where S-VT (19.0%) reduced the fibrotic area compared to B-VT and M-VT (41.9%; $p = 0.02$ and 36.2%; $p = 0.0004$).

Estradiol production

Estradiol secretion was quantified in mouse plasma to assess the endocrine function of the ovarian grafts. All transplanted animals showed estradiol production with values ranging from 10.9 pg/mL to 206.7 pg/mL, according to the different days of the estrous cycle (Figure 1E). Estradiol secretion was higher in samples cryopreserved by slow freezing compared to vitrification for the same decortication method: B-SF: 50.4[29.0-88.9] pg/mL vs. B-VT 28.2[14.4-42.4] pg/mL; M-SF: 74.4[57.4-86.5] pg/mL vs. 32.2[27.0-138.4] pg/mL and S-SF: 56.6[31.8-78.7] pg/mL vs. S-VT: 21.9[13.1-168.4] pg/mL. Statistical analysis to compare values between groups was not performed because samples were obtained at euthanasia on day 21 regardless of the estrous cycle phase of each animal at death.

DISCUSSION

Successful fertility preservation has been widely achieved by ovarian tissue cryopreservation and transplant, and therefore, clinicians and scientists worldwide argue for its classification as an established, rather than experimental, technique [149]. A primary concern is the lack of a standardized stepwise technique applicable to fertility preservation units. The lack of uniformity in clinical practice is further underscored by continued research in the last decade evaluating several factors involved in this complex multi-step procedure. Nevertheless, most studies focus on cryopreservation and transplant, although ovarian tissue size and thickness [49] seem to be crucial to

determining the success of the next steps. To our knowledge, this is the first study to systematically evaluate decortication techniques currently used in fertility preservation programs.

The *in vitro* approach highlights that although the use of microsurgical scissors (M) initially seems to preserve the total follicle number, it can induce an increase in follicular abnormalities followed by a 7-fold rise in stromal cell death and inhibition of the Hippo pathway, which is prone to end in massive follicular activation [196] or burnout [160]. The balance between quiescent and growing populations was not affected by the microsurgical scissors, or any other evaluated method compared to control samples. However, the absence of evident effects can be attributable to the limited time period of only three hours between decortication and sample examination, which might be not enough to detect morphological changes due to follicle growth [161]. These findings were accompanied by a cascade of events involving shear stress molecules such as *HSP60*, that induce inflammation [151]. However, secretion of the downstream protein TNF- α was not increased, suggesting the possibility that tissue repair mechanisms were activated in a cellular attempt to ameliorate any damage to the ovarian cortex in the M-treated samples. In fact, the proportion of good-quality follicles (type I and II according to the Martinez-Madrid et al. [197] classification: TUNEL-negative oocyte and less than 10% apoptotic GC) did not differ between any of the experimental groups or the controls. Nevertheless, repair mechanisms might not fully recover the damage and therefore, the shear stress increase could lead to mechanical damage affecting both follicles and stroma viability observed after 3 h of incubation.

Decortication by scratching with a scalpel blade or slicer did not induce follicular loss or morphological abnormalities, stromal cell damage or mechanical stress, although the slicer and microsurgical scissors induced a modification in Hippo pathway gene

expression, characterized by a significant increase in *BIRC1*, *BIRC7*, *YAP1* and *CCN2* expression [157, 196], which is suitable to initiate follicle activation. This phenomenon should be avoided during the initial tissue preparation steps, as once they are activated, follicles will continue development or undergo atresia and death [163]. This is a major concern related to fragment thickness [198], as activated follicles will not survive the cryopreservation, thawing and transplant procedures. In fact, follicular burnout, induced by ischemia during the first moments after transplant or by follicular recruitment due to absence of growing follicles secreting AMH and other inhibitory molecules [165, 199], is still considered the main limitation of transplant success. Only 35% of follicles present in the graft survive [166] any ischemia-revascularization injury. Therefore, it is desirable to keep follicles at the quiescent stage before grafting.

In addition to the absence of evident negative effects related to using a scalpel blade on ovarian tissue, decreased TNF- α secretion to the culture media following decortication was observed, suggesting that the scratching applied for elimination of the medulla was not enough to trigger a non-desired inflammatory response [167] in the ovarian cortex. This finding is of paramount relevance, as decortication by a scalpel is used clinically in several fertility preservation programs.

Although the *in vitro* study provided useful data, we aimed to obtain the whole picture of ovarian cryopreservation and transplant with the *in vivo* study, in which decortication and cryopreservation techniques were combined before a final step of ovarian tissue transplant to an immunodeficient mouse model. This approach allowed us to properly evaluate additional downstream processes contributing to the conditions of both the follicles and the ovarian stroma.

In general, all samples showed diminished follicular densities after decortication, cryopreservation and transplant compared to fresh control samples, although no

differences were observed in follicular densities among the decortication techniques. This decline has been already described in almost all studies involving ovarian tissue cryopreservation and grafting of both animal [168, 198] and human [124, 199, 200] tissues. Nevertheless, although statistically significant differences were not reported between decortication methods, the M-treated samples seemed to keep higher numbers of follicles in both cryopreservation conditions. Depletion of the follicular pool compromises the fertility potential of ovarian grafts, which was especially dramatic in the B-SF and S-VT samples, although both groups seemed to maintain a balance between quiescent and growing populations, similar to the non-grafted control samples. By contrast, M-SF and B-VT samples showed increased numbers of growing follicles, meaning that after only 21 days, the graft's potential was consumed. Surprisingly, as stated above, grafts treated by B-SF [122, 170] and S-VT [201], two techniques successfully used in clinical practice and with reported live births, showed 100% of follicles at the quiescent stage. This finding does not necessarily mean that follicles are unable to activate, grow and mature, as a 4.5-month period for ovarian activity recovery after transplant in oncology patients has been reported [122, 170, 171] and our xenograft was maintained for only 21-days. However, others reported follicle growth after that amount of time. In fact, estradiol secretion was restored in all animals grafted with ovarian tissue from any group, showing that secondary follicles were present, well-preserved and viable in the grafts [172, 173]. Hence, we should remain cautious regarding the absence of primordial or growing follicles assessed by histological examination in some samples, as reduced follicle numbers and heterogeneous distributions are primary features of human ovarian tissue compared to bovine or rodent ovarian tissues [174, 200]. Histological evaluation of ovarian fragments provides useful information but has some limitations as it does not provide the whole picture of the

follicular composition. Although histological evaluation is considered the gold standard technique for ovarian reserve assessment in experimental studies, obtaining the whole picture of follicular composition would require the study of complementary parameters. Preservation of endocrine function is a major advantage of ovarian tissue cryopreservation vs. oocyte vitrification, and our results showed that all samples in all experimental groups were able to recover endocrine activity by means of estradiol secretion. Comparisons between conditions were not performed since blood was sampled at euthanasia independent of the estrous phase to maintain the grafting period. However, grafts cryopreserved by slow freezing seemed to have improved estradiol production compared to those preserved by vitrification, similar to what was observed by Nikiforov [202].

In contrast, we observed a general pattern of increased graft vascularization and reduced fibrosis in the ovarian stroma of vitrified samples, although proliferation was not affected. These findings agreed with previous studies showing better preservation of stroma, granulosa cells and vessels achieved by vitrification [124, 125, 176-178] than by slow-freezing, which poorly preserved stromal and endothelial cells. The tendency of samples decorticated by M and S with proven Hippo pathway inhibition to display higher MVD values with both cryopreservation methods is also remarkable. This finding could partially be explained by the possibility of Hippo pathway disruption-induced endothelial cell proliferation.

Fibrosis assessment suggested that the decortication method made a key contribution to the final outcome, particularly in blade and microsurgical scissor-treated samples, where fibrosis significantly increased compared to samples subjected to slicer decortication, regardless of the cryopreservation system used. In general, the ovarian stroma seems to be better preserved in the S-decorticated grafts.

In order to propose a candidate technique, we assessed independently the follicular densities and the viability of the stroma. We gave priority to the former, given that there are other steps of the process that could have an additive effect on follicular depletion, such as the cryopreservation technique and the ischemia post-transplantation. Based on that, decortication by a blade should be a good candidate. Although all groups diminished total follicular density, the B-VT and M-VT groups did not reach statistically significant differences for the primordial, primary and secondary follicles when compared to non-grafted samples; grafts from both conditions showed the highest vascularization levels although the fibrosis was extensive. Nevertheless, the Hippo pathway was not disrupted in the B decorticated samples which also showed lower cell damage in stroma and follicles when examined in the in vitro study.

While we cannot conclude that a perfect and universal system exists to process, cryopreserve and transplant the ovarian cortex, our results highlight the fact that every step matter, especially tissue preparation. This idea was previously suggested by Gavish et al. [198] who found that graft thickness was a determinant for xenotransplantation. The authors from this study expected that thinner grafts would better ensure cryoprotectant agent penetration and, therefore, follicle preservation, but they found that thin grafts reduced the follicular pool due to a burnout effect and did not show significant improvement in graft vascularization and proliferation compared to the thicker samples. Our results also highlighted the relevance of this burnout phenomenon to follicular pool depletion, but suggest that this process may initiate during tissue decortication in the transplantation process. Nevertheless, cryopreservation of these grafts showed that there were other crucial changes that occurred in the ovarian cortex in addition to the effects induced by decortication.

Funding

Funded by Fundación Dexeus Salud de la Mujer (2013), by the Regional Valencian Ministry of Education (PROMETEO/2018/137) and by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (PI16/FIS PI16/01664 and PTQ-16-08222 for S.H. participation).

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Andersen AN. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5307-14.
2. Blumenfeld Z. Chemotherapy and fertility. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2012;26:379-90.
3. Meirow D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:123-31.
4. Howlader N NA, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011*. National Cancer Institute Bethesda, MD April 2014.
5. Donnez J, Dolmans MM. Fertility Preservation in Women. *N Engl J Med* 2017;377:1657-65.
6. Gellert SE, Pors SE, Kristensen SG, Bay-Bjorn AM, Ernst E, Yding Andersen C. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J Assist Reprod Genet* 2018;35:561-70.

7. Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:325-33.
8. Milenkovic M, Brannstrom M, Diaz-Garcia C, Lundin K, Selleskog U, Soderlund B *et al.* Spontaneous twin pregnancy with live births after cryopreservation and re-implantation of ovarian tissue. *Gynecol Surg* 2017;14:9.
9. Siebzehnruhl E, Kohl J, Dittrich R, Wildt L. Freezing of human ovarian tissue--not the oocytes but the granulosa is the problem. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:109-11.
10. Amorim CA, David A, Dolmans MM, Camboni A, Donnez J, Van Langendonck A. Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:1157-65.
11. Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW *et al.* Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod* 2006;21:2794-800.
12. Zhou XH, Wu YJ, Shi J, Xia YX, Zheng SS. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology* 2010;60:101-5.
13. Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;108:186-93.
14. Gandolfi F, Paffoni A, Papasso Brambilla E, Bonetti S, Brevini TA, Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril* 2006;85 Suppl 1:1150-6.

15. Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2009;18:568-77.
16. Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A *et al.* Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;24:1670-83.
17. Kim GA, Kim HY, Kim JW, Lee G, Lee E, Lim JM. Ultrastructural deformity of ovarian follicles induced by different cryopreservation protocols. *Fertil Steril* 2010;94:1548-50, 50.e1.
18. Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodriguez B, Diaz C, Sanchez-Serrano M, Mirabet V *et al.* Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril* 2014;101:775-84.
19. Oktem O, Alper E, Balaban B, Palaoglu E, Peker K, Karakaya C *et al.* Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimullerian hormone than slow-frozen ovaries. *Fertil Steril* 2011;95:2661-4 e1.
20. Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B, Lundqvist M, Hovatta O. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Hum Reprod* 2011;26:594-603.
21. Sanchez M, Novella-Maestre E, Teruel J, Ortiz E, Pellicer A. The Valencia Programme for Fertility Preservation. *Clin Transl Oncol* 2008;10:433-8.
22. Escriba MJ, Grau N, Escrich L, Novella-Maestre E, Sanchez-Serrano M. Spontaneous in vitro maturation of oocytes prior to ovarian tissue cryopreservation in natural cycles of oncologic patients. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:1261-5.

23. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod* 2011;26:2461-72.
24. Gavish Z, Peer G, Hadassa R, Yoram C, Meiorow D. Follicle activation and 'burn-out' contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. *Hum Reprod* 2014;29:989-96.
25. Forman EJ. Ovarian tissue cryopreservation: still experimental? *Fertil Steril* 2018;109:443-4.
26. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S *et al.* Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:17474-9.
27. Roness H, Gavish Z, Cohen Y, Meiorow D. Ovarian follicle burnout: a universal phenomenon? *Cell cycle* 2013;12:3245-6.
28. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2000;163:53-60.
29. Noble EG, Shen GX. Impact of exercise and metabolic disorders on heat shock proteins and vascular inflammation. *Autoimmune Dis* 2012;2012:836519.
30. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004;82:1390-4.
31. Pan D. Hippo signaling in organ size control. *Genes & development* 2007;21:886-97.
32. Greenwald GS. Of eggs and follicles. *Am J Anat* 1972;135:1-3.

33. Gavish Z, Peer G, Roness H, Hadassa R, Cohen Y, Yoram C *et al.* Follicle activation and 'burn-out' contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. *Hum Reprod* 2014;29:989-96.
34. Ayuandari S, Winkler-Crepaz K, Paulitsch M, Wagner C, Zavadil C, Manzl C *et al.* Follicular growth after xenotransplantation of cryopreserved/thawed human ovarian tissue in SCID mice: dynamics and molecular aspects. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:1585-93.
35. Silber S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:1595-603.
36. Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. *Endocrinol* 1999;140:462-71.
37. Arias JI, Aller MA, Arias J. Surgical inflammation: a pathophysiological rainbow. *Transl Med* 2009;7:19.
38. Gavish Z, Ben-Haim M, Arav A. Cryopreservation of whole murine and porcine livers. *Rejuvenation Res* 2008;11:765-72.
39. Gavish Z, Spector I, Peer G, Schlatt S, Wistuba J, Roness H *et al.* Follicle activation is a significant and immediate cause of follicle loss after ovarian tissue transplantation. *J Assist Reprod Genet* 2018;35:61-9.
40. Diaz-Garcia C, Domingo J, Garcia-Velasco JA, Herraiz S, Mirabet V, Iniesta I *et al.* Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study. *Fertil Steril* 2018;109:478-85.e2.

41. Silber SJ, DeRosa M, Goldsmith S, Fan Y, Castleman L, Melnick J. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA. *Assist Reprod Genet* 2018;35:2205-13.
42. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT *et al.* Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril* 2013;99:1503-13.
43. Sanyal MK, Berger MJ, Thompson IE, Taymor ML, Horne HW. Development of graafian follicles in adult human ovary. I. Correlation of estrogen and progesterone concentration in antral fluid with growth of follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;38:828-35.
44. Fowler RE, Fox NL, Edwards RG, Steptoe PC. Steroid production from 17alpha-hydroxypregnenolone and dehydroepiandrosterone by human granulosa cells in vitro. *J Reprod Fertil* 1978;54:109-17.
45. Schmidt KL, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Muller J, Yding Andersen C. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Hum Reprod* 2003;18:1158-64.
46. Nikiforov D, Russo V, Nardinocchi D, Bernabò N, Mattioli M, Barboni B. Innovative multi-protectoral approach increases survival rate after vitrification of ovarian tissue and isolated follicles with improved results in comparison with conventional method. *J Ovarian Res* 2018;11:65.
47. Dolmans MM, Binda MM, Jacobs S, Dehoux JP, Squifflet JL, Ambroise J *et al.* Impact of the cryopreservation technique and vascular bed on ovarian tissue transplantation in cynomolgus monkeys. *Assist Reprod Genet* 2015;32:1251-62.

48. Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla SJ. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2008;90:1480-6.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *In vivo* graft analysis after cryopreservation and xenograft. A) Primordial and primary follicular densities from all experimental groups were reduced after tissue decortication, cryopreservation and xenograft compared to non-grafted control fresh samples. Densities were not statistically different between experimental groups in the recovered ovarian grafts. B) Microvessel density (MVD) was established by CD31+ area, showing increased vascularization in the ovarian cortex from the microsurgical scissors (M)-slow freezing (SF) and slicer (S)-SF groups compared to blade-treated (B)-SF samples. C) Fibrotic area was established, and was decreased in the S-SF samples compared to the M-SF samples; in vitrified (VT) grafts, fibrotic area was lower in the S-VT samples compared to B-VT and M-VT. D) High magnification images (20 x) from the Masson trichrome staining showing collagen-positive fibrotic area in blue. E) Estradiol secretion boxplots. * p-value <0.05; *** p-value<0.001

Supplemental Figure 1. Experimental design scheme. A) *In vitro* and B) *In vivo* experimental design.

Supplemental Figure 2. Hippo pathway analysis. Microsurgical scissor-(M) and slicer-(S) treated samples showed significantly increased relative expression in the primary genes of the Hippo pathway, indicating that the route has been inhibited. * = p < 0.05 compared to non-decorticated control samples (C). B: blade-treated samples.

Supplemental Figure 3. Histological assessment of ovarian cortex after xenograft. Fresh ovarian cortices with numerous follicles at all developmental stages. After

decortication, cryopreservation/thawing and xenotransplantation, follicular densities were reduced, although follicles were detected in grafts from all experimental groups. Fresh ovarian cortex samples images showing primordial (10X), tertiary and antral follicles (20X), respectively. Slow freezing cryopreserved samples (SF) from the blade (B), microsurgical-scissors (M) and slicer (S) treated grafts (10X) with primordial follicles in the ovarian cortex. Vitrified samples (VT) in the B- and M-treated grafts (20X) showed primary follicles. Three primordial follicles are shown in a slicer (S)-VT graft (10X).

Table 1. *In vitro* and *in vivo* follicular densities and percentages. Values were expressed as mean \pm SD (Median).

Group	Follicular density (follicles/mm ³)				Follicular populations (%)		
	Primordial	Primary	Secondary	Total	Quiescent	Growing	
In vitro study	Control (C)	28.8 \pm 30.3 (19.3)	7.7 \pm 14.1 (3.0)	1.7 \pm 2.8 (0.0)	38.2 \pm 36.9 (29.2)	60.1 \pm 41.6 (70.9)	39.9 \pm 41.6 (19.2)
	Blade (B)	20.2 \pm 17.5 (15.3)	3.4 \pm 3.3 (2.7)	0.8 \pm 1.2 (0.0)	24.3 \pm 9.8(20.4)	83.2 \pm 13.9(83.5)	16.8 \pm 13.9 (16.5)
	Microsurgical scissors (M)	63.3 \pm 10.1 (19.1)	3.8 \pm 2.0 (3.3)	1.8 \pm 2.5 (1.0)	68.5 \pm 104 (21.9)	81.9 \pm 16.2(87.0)	18.1 \pm 16.2 (13.0)
	Slicer (S)	34.1 \pm 39.6 (21.3)	2.9 \pm 4.2 (0.7)	1.4 \pm 3.7 (0.0)	38.4 \pm 39.1(27.1)	75.4 \pm 35.0(91.1)	24.6 \pm 35.0 (9.9)
In vivo study	Non-grafted control	7.5 \pm 11.1 (1.7)	3.5 \pm 6.0 (1.0)	1.1 \pm 2.4 (0.1)	33.8 \pm 95.4 (3.3)	53.3 \pm 29.3(50.0)	46.7 \pm 29.3(50.0)
	B+SF	0.3 \pm 0.4 (0.0)	0.1 \pm 0.2(0.0)*	0.05 \pm 0.0 (0.0)	0.5 \pm 0.6 (0.3)*	86.6 \pm 23.1(100)	13.3 \pm 23.1(0.0)
	M+SF	1.3 \pm 3.6 (0.0)*	0.5 \pm 0.7(0.2)	0.1 \pm 0.2(0.0)	1.9 \pm 4.1(0.7) *	20.8 \pm 41.7(0.0)	79.2 \pm 41.6 (100)
	S+SF	0.5 \pm 1.0 (0.0)	0.3 \pm 0.4 (0.0)*	0.0 \pm 0.1(0.0)	0.8 \pm 1.4 (0.2) *	55.6 \pm 42.3(61.1)	44.4 \pm 42.3(38.8)
	B+VT	0.4 \pm 0.7(0.0)	0.8 \pm 1.1((0.2)	0.1 \pm 0.1(0.0)	1.2 \pm 1.4 (0.2)*	22.2 \pm 30.7 (0.0)	77.8 \pm 30.7(100)
	M+VT	2.2 \pm 5.6(0.0)	0.9 \pm 1.8(0.1)	0 \pm 0 (0.0)	3.2 \pm 7.4 (0.1) *	60.4 \pm 42.7 (70.8)	39.6 \pm 42.7(29.2)
	S+VT	0.3 \pm 0.5(0.0)	0.1 \pm 0.1(0.0)*	0.1 \pm 0.1(0.0)	0.4 \pm 0.5(0.3)*	86.1 \pm 27.8 (100)	13.9 \pm 27.8(0.0)

* p<0.05 compared to non-grafted controls. Blade (B), Microsurgical scissors (M), Slicer (S), Slow freezing (SF) and Vitrification (VT).

Table 2. Cell damage. TUNEL quantification in follicles and stoma. Values are expressed as mean \pm SD.

Group	TUNEL in follicles		TUNEL positive area in ovarian stroma (%)
	Type I	Type II	
Control (C)	98.3 \pm 3.2	1.3 \pm 2.8	2.4 \pm 6.4
Blade (B)	96.7 \pm 9.3	2.0 \pm 5.6	9.2 \pm 14.3
Microsurgical scissors (M)	84.3 \pm 31.5	15.7 \pm 35.0	17.8 \pm 21.1 ^{*,¥}
Slicer (S)	87.2 \pm 33.1	1.7 \pm 5.7	1.1 \pm 3.1

*p=0.022 vs. control samples and ¥ p=0.041 vs. Slicer

Table 3. Status of ovarian stroma after xenograft. Values are expressed as medians [IQR]. Microvessel density (MVD), Blade (B), Microsurgical scissors (M), Slicer (S), Slow freezing (SF) and Vitrification (VT).

	B-SF	M-SF	S-SF	B-VT	M-VT	S-VT
MVD (%)	0.31 [0-0.9]	1.8 [1.2-3.4]	0.5 [0.3-1.5]	1.5 [0.0-2.1]	1.4 [0.5-1.6]	1.3 [0.3-1.8]
Proliferation (%)	0.0 [0.0-0.1]	0.1 [0.0-0.3]	0.0 [0.0-0.1]	0.2 [0.0-0.2]	0.6 [0.1-1.2]	0.1 [0.0-0.1]
Fibrosis (%)	37.7 [27.6-44.2]	45.2 [38.0-48.0]	24.1 [12.4-34.4]	41.9 [31.3-49.6]	66.2 [19.1-50.2]	19.0 [6.9-21.3]

