EL TRASPLANTE Y LA CRIOPRESERVACION DE OVARIOS COMO HERRAMIENTAS PARA PRESERVAR EL MATERIAL GENETICO DE HEMBRAS BOVINAS

AUTORES

DAVID SANCHEZ POSADA

SEBASTIAN RESTREPO VELEZ

FANNY MORENO ESCOBAR

COAUTOR

MARIA PATRICIA ARIAS GUTIERREZ

GRUPO DE INVESTIGACIÓN

INCA CES

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

REPRODUCCION

UNIVERSIDAD CES

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MEDELLIN

2010

INDICE

1. Introducción.....4
2. Aspectos generales……..5
3. Aspectos reproductivos de la hembra bovina……6
3.1 Consideraciones anatómicas del tracto reproductivo……6
3.1.1 Anatomía topográfica del ovario……....8
3.1.1.1 Corteza y medula……9
3.1.1.2 Vascularización e inervación……..9
3.1.1.3 Estructuras linfáticas de la pelvis……10
3.2 Consideraciones fisiológicas……10
1.2.1 Dinámica folicular……..11
1.2.2 Inmunología reproductiva……12
4. Trasplante ovárico……13
4.1 Antecedentes históricos……..13
4.2 Aplicaciones del trasplante ovárico y la criopreservación……14
4.3 Procedimientos previos……..18
4.3.1 Anestesia en rumiantes……..18
4.3.2 Consideraciones preanestésicas……18
4.3.2.1 Examen físico……..18
4.3.2.2 Selección del sitio……18
4.3.2.3 Posicionamiento del paciente……19
4.3.2.4 Uso de catéter en rumiantes……20
4.3.2.5 Intubación endotraqueal……21
4.3.2.6 Entrega de oxigeno y protección de musculo y nervio..23
4.3.2.7 Ayuno antes de la anestesia……23
4.3.2.8 Protección de los ojos……24
4.4 Manejo de la inmunosupresión……25
4.5 Técnicas de trasplante……..26
4.5.1 Autotrasplante……27

4.5.2 Alotrasplante……30
4.5.3 Xenotrasplante……36
4.6 Procedimientos posteriores al trasplante ovárico……39
4.7 Respuestas adaptativas al trasplante……..40
4.8 Monitoreo en el periodo postquirúrgico……40
4.9 Criopreservación de ovarios……..43
4.10 Vitrificación……..47
5 Consideraciones éticas……..50
6 Conclusiones……...52
7 Referencias ……54

1. INTRODUCCION

En nuestro país, con frecuencia, se da la pérdida de hembras bovinas de alto valor por muerte, descarte o diversos factores como accidentes, enfermedades o vejez, provocando así, que el material de estos animales genéticamente valiosos se pierda[1,2] El trasplante y la criopreservacion ovárica en los bovinos, son herramientas que permitirían conservar el material genético de animales de alto valor comercial; con mayor eficiencia que otras técnicas como la aspiración folicular o la congelación de oocitos, dado que estas técnicas permiten preservar el 100% del material genético, al permitir perpetuar la viabilidad de un ovario con todo su material reproductivo, si se cuenta con un animal receptor.

Es posible extraer los ovarios y conservarlos por un periodo de tiempo determinado, para luego volverlos a implantar después de un tratamiento exitoso; aunque diversas tecnicas se ha realizado en diferentes especies animales, incluso en humanos,varios países, la investigación sobre las adaptaciones al trasplante continua, y las perspectivas futuras son amplias[3].

Adams y Pierson, señalan las similitudes con respecto a la fisiología ovárica entre bovinos y humanos. Ambas especies son policíclicas y mono-ovulatorias, el tamaño y la morfología del ovario son comparables, la reserva folicular está localizada en la corteza, y la ovulación puede ocurrir en cualquier punto de la superficie ovárica [4]. Por lo anterior, los autores sugieren que el bovino seria un excelente modelo animal para estudiar la dinámica folicular en humanos, ya que su estudio en mujeres es limitado por razones éticas.[5]

Para desarrollar un protocolo de la técnica de trasplante ovárico en bovinos de una manera segura y bien fundamentada, es necesario hacer una recopilación de material bibliográfico sobre las bases reproductivas y fisiológicas relacionadas con este procedimiento, sobre la técnica per sé, y sobre la viabilidad de la criopreservación de ovarios en hembras bovinas. Es importante centar bases sobre el desarrollo de esta técnica ya que se está planteando la posibilidad de cambiar el mmodelo ovino por el modelo bovino, con fines de desarrollar estudiar los aspectos relacionados con el trasplante ovárico y desarrollar la técnica quirúrgica en humanos.

2. ASPECTOS GENERALES

Son los estándares de calidad, los que dan las bases de competitividad al sector ganadero de Colombia; en estos estándares se debe considerar el crecimiento del hato bovino, el mejoramiento genético, a través de buenas prácticas zootécnicas y de la prevención, detección y erradicación de enfermedades[1]. Dentro de la cadena cárnica, en sus bases, debe considerarse la hembra bovina como factor fundamental en la reproducción y repoblamiento ganadero, que permita conseguir los estándares de producción en la ganadería colombiana[2]; motivo por el cual esta revisión bibliográfica tiene como objetivo recopilar y dar a conocer las bases teóricas que soportan el trasplante ovárico en bovinos para que se pueda desarrollar la técnica con sólidos fundamentos y continuar la investigación en este innovativo campo de la reproducción bovina.

La biotecnología de la reproducción tiene un gran campo para su desarrollo, de esta manera ya se han logrado animales transgénicos así como animales clonados a partir de células somáticas y recientemente bovinos transgénicos clonados[5]. Los avances alcanzados en la fisiología de la reproducción, en el tratamiento de diversos trastornos reproductivos, y la aplicación de métodos para elevar la eficiencia de la reproducción en bovinos, han estado condicionados en gran parte por el progreso de las técnicas en biología molecular y genética, y se

han abierto nuevos temas interesantes en el campo de la reproducción que hace unos años eran una utopía. Son importantes además los temas relacionados con la transferencia de embriones (microcirugía, transferencia intergenéricas), control de la reproducción por métodos cibernéticos, evaluación de la fertilidad a nivel de laboratorio (capacitación del espermatozoide y fertilización in vitro del óvulo) [6]. Para continuar el desarrollo de esta área de la reproducción, es necesario pensar y desarrollar nuevas técnicas y en especial, plantear nuevos retos[7]. La presente monografía será la base teórica para desarrollar las técnicas de trasplante ovárico y criopreservacion, que a su vez permitirán rescatar el material genético en peligro de perdida, en aquellas vacas que se pierden o que deben ser descartadas por cualquier motivo.

La importancia del trasplante ovárico en bovinos radica en que esta técnica permite conservar y aprovechar el potencial genético de las hembras bovinas de una manera más eficiente que cuando se realiza aspiración folicular. Con la aspiración folicular se pueden recuperar los folículos primordiales que haya en el ovario en el momento en que se toman, mientras que con el trasplante ovárico se preserva la totalidad del ovario, su funcionalidad no se ve afectada, y éste continúa ciclando por un largo periodo de tiempo, lo cual permite que se preserve en una hembra receptora el material genético de una donante que por alguna razón debe ser sacrificada (como una fractura o enfermedad que no afecta al sistema reproductivo). Similarmente, la criopreservación de ovarios o tejido ovárico permiten conservar el material genético por largos periodos de tiempo, aun cuando la hembra deba ser descartada[8].

3. Aspectos reproductivos de la hembra bovina

3.1 Consideraciones anatómicas del tracto reproductivo

El tracto reproductivo de la hembra bovina es una compleja estructura de órganos y ductos. De exterior hacia interior del animal, encontramos la vulva, vestíbulo vaginal, cérvix, útero, oviductos y ovarios [9].

La vulva es la apertura externa del tracto reproductor, es la única parte visible desde afuera de la vaca. Con 3 a 4 pulgadas de largo en el plano medio, la vulva está localizada inmediatamente debajo de la abertura externa del recto y de la cola. La vulva está compuesta de pliegues de piel (epitelio estratificado escamoso, queratinizado) y pelos que ofrecen una adecuada protección a las estructuras internas del órgano reproductor. La vulva y el vestíbulo son las únicas partes que comparten el tracto urinario y el tracto reproductivo [10].

El vestíbulo es la primera estructura que se encuentra craneal a la vulva, mide 3-4 pulgadas de largo, cubierto por tejido escamoso, de epitelio no queratinizado. La abertura externa de la uretra está localizada en el piso del vestíbulo. Caudal a esta estructura podemos encontrar un saco ciego (divertículo suburetral) [10].

La vagina se localiza craneal al vestíbulo y se extiende cranealmente por cerca de 8 pulgadas hasta la entrada del cerviz. Cubierta por epitelio estratificado escamoso no queratinizado. La vagina sirve de receptor del semen cuando se realiza la monta natural [10].

El cérvix mide de 4 a 5 pulgadas de largo y unas 2 pulgadas de ancho, es de suma importancia en la reproducción bovina. En general el cérvix es una rápida disminución del tamaño del tracto reproductor que sirve de protección del útero a la entrada externa de contaminantes que de otra manera fácilmente entrarían desde la vagina. Durante la preñez el cérvix crea un tapón natural (tapón cervical) para crear un medio estéril y seguro en el que vivirá el feto. La luz del cérvix es muy angosta y contiene una serie de pliegues de la mucosa que forma 3 o 4 anillos internos inclinados en dirección caudal. Hay algunas ramificaciones de

estos principales o secundarios anillos que ayudan al transporte y reservorios del semen [10].

Craneal al cérvix, se encuentra el útero, envuelto en el ligamento ancho del útero que le proporciona gran movilidad. Compuesto por epitelio ciliar columnar, el útero es el lugar donde se lleva a cabo la gestación, es el responsable de brindar protección al feto y mantener una compleja comunicación entre la madre y el feto. Tiene un tejido secretor que produce la “leche uterina” que sirve de nutriente para el embrión durante las primeras etapas de la gestación. En el útero se pueden encontrar alrededor de 100 a 120 carúnculas del tamaño de un grano de maíz distribuidas uniformemente en el endometrio. Estas carúnculas sirven de punto de conexión para la placenta durante la preñez. Las carúnculas se unen íntimamente a los cotiledones para formar unas estructuras vascularizadas llamadas placentomas [10].

Desde el punto de vista anatómico el útero puede dividirse en cuerpo del útero y dos cuernos. El cuerpo del útero es la primera parte del útero en dirección caudo-craneal y es la única porción compartida de las dos mitades derecha e izquierda del útero. Internamente tiene una medida de 2 pulgadas de largo antes de la iniciación de la bifurcación interna, Los cuernos uterinos son la continuación directa del cuerpo del útero. Cada cuerno (derecho e izquierdo) es una estructura cilíndrica y simétrica de cerca de 8-12 pulgadas de longitud y cerca de 2 pulgadas de diámetro. Después de la bifurcación externa y continuando en forma craneal los cuernos se doblan en una posición ventro-caudal y después se vuelven a doblar en forma dorsal para juntarse al oviducto [10].

El oviducto está constituido por el istmo, ámpula e infundíbulo. Tiene un tamaño de 7 pulgadas de largo y ¼ de pulgada de ancho cada uno (derecho e izquierdo) se convierte en la estructura que une los cuernos uterinos con el ovario, además de ser el sitio donde se lleva a cabo la fertilización [10].

3.1.1 Anatomía topográfica del ovario

Cada ovario es un cuerpo elipsoidal, solido, por lo común irregular, debido a la proyección en la superficie de los grandes folículos y los cuerpos lúteos. La irregularidad es mayor naturalmente en las especies politocas, en las que los folículos maduran en grupo. Los ovarios, aunque son mucho más pequeños que los testículos de los machos de la misma especie, tampoco guardan una proporción constante con el tamaño del cuerpo. Los ovarios suelen estar en la parte dorsal del abdomen, cerca de las puntas de los cuernos del útero ya que no se desvían mucho del lugar que ocupan durante el desarrollo. La migración más importante ocurre en los rumiantes, en los que los ovarios llegan a situarse cerca de la entrada pélvica. Cada ovario está suspendido dentro de la parte craneal (meso-ovario) del ligamento ancho, la suspensión común dl tracto reproductor femenino.[11]

3.1.1.1 Corteza y medula

El ovario está conformado por corteza y médula, está rodeado por el epitelio superficial, comúnmente llamado epitelio germinal. La medula ovárica consiste en tejido conectivo fibroelástico y regularmente dispuesto y extensos sistemas vascular y nervioso que llegan al ovario a través del íleo, las arterias están dispuestas en una espiral bien definida. La corteza ovárica contiene folículos ováricos, cuerpos lúteos o ambos, en diferentes etapas de desarrollo o regresión.[9]

La sección a través del ovario de un animal maduro muestra una parte central más laxa y vascularizada contenida dentro de una corteza más densa. La zona parenquimatosa está limitada por una túnica albugínea directamente debajo del peritoneo con folículos en varias etapas de desarrollo y regresión. Cada folículo contiene un único oocito.[11]

3.1.1.2 Vascularización e inervación del Ovario

La arteria ovárica es relativamente pequeña y vasculariza el ovario, la trompa uterina y la porción próxima del cuerpo uterino; su rama uterina se anastomosa con las ramas mas craneales de la arteria uterina. La arteria ovárica se distingue por su curso extremadamente sinuoso a su paso por la porción más craneal del ligamento ancho. Este curso zigzagueante se parece al de la arteria testicular, y el amplio contacto que establece a lo largo de la vena ovárica, que tiene una disposición plexiforme, facilita la transferencia contracorriente de prostaglandinas desde la sangre venosa a la sangre arterial; el ovario esta inervado por nervios de los sistemas simpáticos y parasimpáticos. [11]

3.1.1.3 Estructura linfáticas de la pelvis

Los nódulos linfáticos existentes en el interior de la pelvis son bastante pequeños y de presencia y distribución inconstantes. La mayor parte de la linfa procedente de los órganos pélvicos se dirige directamente a los nódulos iliacos mediales y sacros situados alrededor de la bifurcación de la aorta. Los nódulos linfáticos ano-rectales y mesentéricos caudales dispersos sobre las paredes del recto y del canal anal. Los nódulos hipogástricos se encuentran a veces sobre la cara interna del ligamento sacrociático. Los nódulos hipogástricos pueden unirse a los del linfocentro iliaco medial; cuando están separados, parecen ser los responsables del drenaje linfático de la porción dorsal de las paredes de la pelvis, de la cola, músculos lumbares o glúteos y de los órganos genitales y urinarios. Todo el flujo linfático eferente procedente de la pelvis es conducido al linfocentro iliaco medial y desde allí pasa al origen del tronco linfático lumbar. El nódulo inguinal profundo (ilio-femoral) recibe linfa procedente de los músculos glúteos y del muslo, de los nódulos mamarios y poplíteos y posiblemente también, de los órganos genitales [11]. Esta irrigación linfática es determinante de un trasplante, pues favorece la eliminación de productos inflamatorios, además de participar en la respuesta inmune después del trasplante.

3.2 Consideraciones fisiológicas

Los conocimientos en la reproducción y en inmunología reproductiva han permitido grandes avances en el desarrollo del área de la biotecnología. Es importante considerar algunos aspectos fisiológicos básicos en la presente monografía, ya que los mecanismos reproductivos pueden verse afectados de alguna manera por el trasplante ovárico.

3.2.1 Dinámica folicular

La foliculogénesis se define como una serie de procesos recurrentes de reclutamiento, selección, y ovulación durante el ciclo estral de la hembra bovina, regulados por una combinación de interacciones entre hormonas, factores de crecimiento, sistemas de comunicación celular y genes. Un concepto importante cuando se hace referencia a la dinámica folicular durante el ciclo estral en vacunos es el de ondas foliculares. Gracias al empleo de la ecografía en vacunos se han conseguido establecer los patrones de crecimiento folicular en hembras prepúberes con 2 semanas de edad, en novillas, en vacas postparto, en gestantes, en vacas anovulatorias o en vacas que habían recibido tratamientos de sincronización.[12]

Un concepto importante cuando se hace referencia a la dinámica folicular durante el ciclo estral en el vacuno es el de ondas foliculares. Algunos investigadores sostenían que el crecimiento folicular era continuo e independiente del ciclo (Donaldson y Hansel, 1968; Dufour et al., 1972; Spicer and Echternkamp, 1986), pero Rajakoski (1960) introdujo este nuevo concepto de onda folicular, afirmando que la población de folículos que emergen en los ovarios durante el ciclo estral se caracterizan por una fase de crecimiento, seguida de una fase estática y final mente ovulan o entran en atresia, con diferentes patrones de desarrollo, siendo los más frecuentes aquellos compuestos por dos y tres ondas foliculares [13]. También

es posible encontrar ciclos estrales con 1 ó 4 ondas foliculares, aunque no es lo más frecuente[12]. Varios estudios demuestran que después de un trasplante ovárico la reanudación de la actividad folicular es exitosa.

En las especies monovulatorias como los bovinos, existe un mecanismo que selecciona un solo folículo de un gran número de folículos, para que se desarrolle y ovule. Durante este proceso, hay una fase común de crecimiento posterior al surgimiento de la onda, seguida por un cambio en la tasa de crecimiento entre el folículo dominante y los folículos subordinados, que es conocida como desviación ó divergencia folicular [14].

Según Pfeifer et al, 2009, se ha demostrado que en terneras de más de 2 semanas de edad, se producen patrones de onda similares a los del desarrollo folicular ovárico, y que el diámetro máximo de los folículos dominantes sigue aumentando durante el período de la pubertad en las hembras jovenes. Al estudiar los patrones existentes en estas terneras, se encontró, que estas tienen un desarrollo y mecanismos de control similares a los vistos en novillas durante el ciclo estral. Además, la función reproductiva continua mejorando después de la primera ovulación, es así que en hembars jóvenes, el diámetro folicular es menor al visto en hembras adultas [15].

3.2.2 Inmunología reproductiva

El aumento de los trastornos reproductivos en los bovinos se ha asociado con alteraciones en los mecanismos inmunes propios de la especie. Se ha descrito que los animales son más susceptibles a contraer infecciones reproductivas durante el periodo periparto y en ciertos momentos del ciclo ovárico [16]. Se sabe además, que los macrófagos son reclutados en gran número en el endometrio interplacentomal de la vaca durante la preñez [17]. Algunos estudios han

demostrado que la respuesta inmune local desencadenada en el tracto reproductivo en el periodo periparto, y en ciertos periodos del ciclo estral es necesaria y protectora, y que las variaciones en esta respuesta inmune se relacionan con numerosos procesos inflamatorios, y con la incidencia de varias enfermedades de importancia económica como la metritis y mastitis. Se plantea que el éxito de la preñez depende en gran parte de una adecuada respuesta inmune local.[16] Se ha descrito que después de un trasplante de órganos reproductivos, la respuesta de rechazo y la inmunidad humoral no es diferente que la observada en otros órganos.[17]

4. Trasplante ovárico

4.1 Antecedentes históricos

La biología del trasplante se considera a menudo como un campo relativamente nuevo de la ciencia, realmente, existe evidencia de que este tema ha sido considerado desde la antigüedad. El trasplante de órganos se remonta al siglo III después de Cristo. El trasplante fue hecho originalmente para ayudar a los seres humanos, y se describen muchos casos en los cuales el tejido del donante es de origen animal. Sorprendentemente, se describieron xenoinjertos de tejido del pene en seres humanos realizados en la antigua China (El Libro Ilustrado de informes sexual. # 1974, 1982, 1997-2001, Simons GL), como también transfusiones de sangre de ovejas a humanos en el año 1667 [18].

Hay citas que datan de hace más de 100 años, en las cuales describen que se realizaron injertos gonadales [18]. La idea de realizar xenoinjertos es también muy antigua y se describe en la literatura (Western Mythology Oriental) [18] Sin embargo, el acercamiento científico al xenotrasplante solo se desarrolló una vez fue reconocida la importancia del sistema inmune en este campo; la naturaleza inmunológica del rechazo de órganos sólo se estableció por primera vez por Medawar [1950][19]. El descubrimiento y posterior uso de líneas inmunodeficientes

de ratones fue todo un hito. [18], lo cual, junto con el deseo de superar los problemas de escasez de donantes de órganos para transplante impulsó el desarrollo del xenotrasplante. [18]

A principios de 1900, varios intentos aislados de xenotrasplante, principalmente trasplantes de riñón, se llevaron a cabo en el hombre utilizando diversos donantes de especies como conejos, cerdos, corderos, y primates no humanos. Estos procedimientos se llevaron a cabo sin ningún tipo de comprensión o de manejo de los mecanismos implicados en el rechazo de xenoinjerto. Aunque estos estudios mostraron que los órganos de los animales funcionan en el cuerpo humano, ninguno de estos órganos sobrevivió más allá de unos pocos días [20]. Hoy en día, el uso de un régimen inmunosupresor consistente con medicamentos como Azatioprina, Actinomicina C, esteroides, y la irradiación del injerto, ha hecho posible que los injertos xenogénicos sobrevivian hasta varios meses [18]. En algunos estudios se usaron riñones de chimpancés, pero en contraste con el trasplante de injertos alogénicos, el rechazo a largo plazo fue inevitable. Aunque estos resultados fueron alentadores en su momento, era evidente que los obstáculos inmunológicos de los xenotrasplantes, aún no se habían superado. [21]

Actualmente se notifican tasas muy altas de supervivencia en individuos sometidos a trasplante de órganos debido a los avances en la técnica, la preservación de órganos y la inmunosupresión. Este éxito ha generado un crecimiento explosivo en el trasplante de órganos como alternativa de tratamiento de diversas enfermedades, aunque a su vez esto ha suscitado una escasez de órganos humanos para donación. Hoy en día, el modelo más utilizado en investigación del xenotrasplante es el murino, utilizándose una serie de líneas de ratones con sistemas inmunes deficientes que no rechazan el tejido de cualquier otra especie. [22].

4.2 Aplicaciones del trasplante ovárico y la criopreservación

El trasplante de órganos reproductivos empezó hace aproximadamente 100 años en modelos animales y en humanos [23]. El injerto de ovario ha sido practicado por décadas en ratones con pobre desempeño reproductivo, pero el potencial del trasplante de tejido ovárico no fue plenamente apreciado hasta 1990, cuando se realizó un injerto de ovario luego de haber sido sometido a criopreservación. [7, 8]. Este hecho permitió que en mujeres que requirieran de quimioterapia, y que podrían quedar estériles por el tratamiento, se conservara congelado parte del tejido ovárico antes del tratamiento. Ahora es posible entonces que luego de la quimioterapia, el tejido ovárico se pueda implantar de nuevo para restaurar los ciclos menstruales, la producción de ovocitos maduros y sobre todo para dar al paciente la oportunidad de tener su propio hijo.

Los avances en el diagnostico y tratamiento de cáncer con quimioterapia y radioterapia han permitido que la esperanza de vida para muchas mujeres que padecen de esta enfermedad aumente, y se estima que en un lapso de 5 años, una de cada 250 mujeres será sobreviviente del cáncer [24]. Sin embargo estos tratamientos de forma reiterada comprometen la función ovárica y dejan como resultado la infertilidad y la menopausia prematura, como consecuencia de lo anterior, cada día se incrementa más la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que preserven la fertilidad de las pacientes [25]. La extracción y conservación de las gónadas femeninas ha sido una excelente alternativa para evitar la infertilidad al evadir los efectos secundarios que generan los tratamientos a nivel reproductivo. Gracias a esta técnica las mujeres que requieren de quimioterapia o radioterapia podrán tener una vida reproductiva sana posterior a estos tratamientos. Igualmente, se argumenta que la criopreservación de ovocitos es una posibilidad para las pacientes pre-púberes y para las mujeres que no tienen tiempo suficiente para recoger los ovocitos maduros antes de que su tratamiento contra el cáncer inicie.[24]

El trasplante de ovarios es también una alternativa de tratamiento para pacientes con disgenesia ovárica o Síndrome de Turner. Esta disgenesia es la anormalidad cromosómica más común, con una incidencia de 1 en 2.000 mujeres. Los pacientes con esta disfunción presentan ovarios no funcionales, ausencia de caracteres sexuales secundarios y amenorrea; estas personas requieren de terapia hormonal de por vida, lo cual aumenta el riesgo de desarrollar neoplasias malignas. Adicionalmente, la terapia hormonal solamente ayuda a atenuar las características fenotípicas, sin embargo, la función reproductiva no es normal, y las jóvenes que padecen esta enfermedad son estériles de por vida. Se han reportado varios casos de trasplantes con éxito de preñez en mujeres [26,27].

A pesar de los avances en el tema y las aplicaciones anteriormente mencionadas sobre el trasplante ovárico, algunas entidades como la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología recomiendan que el esta técnica sea considerada como un procedimiento experimental, ya que el principal obstáculo para el éxito de esta técnica parece ser la escasa viabilidad del folículo ovárico debido al daño hipóxico [28]. La recomendación de esta y otras entidades, por razones éticas y en particular, para ofrecer mayor seguridad a los pacientes que se someten a este tipo de procedimientos, es continuar la investigación en este campo con especies animales que puedan servir como modelo para estudiar los aspectos relacionados con la técnica de trasplante y con las reacciones posteriores de rechazo o adaptación [27].

Hasta el momento, por razones prácticas, se ha considerado el ovino como modelo para el estudio de los aspectos relacionados con el trasplante, sin embargo, el bovino es la especie que más semejanzas anatómicas y fisiológicas presenta con el ovario de la mujer, razón por la cual algunos investigadores sugieren que los estudios de trasplante se deben realizar preferiblemente con esta especie, y aunque los costos son moderadamente mayores, los resultados justifican trabajar con esta especie. Adicionalmente, el alto valor genético y

comercial de algunas hembras bovinas justifica la implementación de esta técnica en la especie bovina, en favor del mejoramiento genético y la reproducción.

En cuanto a la técnica de criopreservación, los bancos de conservación de ovarios de animales o de sus partes tienen un potencial considerable, y se han generado muchas expectativas sobre esta alternativa. Algunos centros de acopio en el mundo están recogiendo tejido ovárico con la respectiva información genómica de especies animales amenazadas y en peligro de extinción como medio de preservación genética y de protección a la diversidad. La congelación de tejido ovárico es un método sencillo y eficaz que permite la conservación de los ovarios de hembras en diferentes etapas de desarrollo, y actualmente se congelan ovarios maduros, fertilizables, ovocitos, folículos ováricos o piezas aisladas, por medio de maduración in vitro o in vivo. El objetivo de estos centros es mejorar estas técnicas de congelación y continuar con la alimentación de estos bancos. Las barreras inmunológicas asociadas con injerto de tejido ovárico entre los individuos han sido un obstáculo para el uso de estas técnicas in vivo, sin embargo, estos problemas pueden ser eludidos por medio del xenotrasplante. [29].

La criopreservación es un procedimiento que ha sido propuesto como una opción para preservar la fertilidad en mujeres en varias clínicas de fertilidad en el mundo presenta numerosas ventajas en la medicina humana: permite el almacenamiento de un gran número de folículos primarios y primordiales, que pueden ser aprovechados en cualquier momento del ciclo menstrual, y es la única opción disponible para preservar la fertilidad en niñas[30].

La criopreservación también beneficia a mujeres con patologías benignas como la drepanocitosis y talasemia, pacientes afectados por enfermedades autoinmunes como lupus, desordenes genéticos asociados con falla ovárica prematura. Adicionalmente, este procedimiento es útil en mujeres con patologías benignas del ovario que requieran ovoforectomía, y dado que estas patologías no oncológicas representan el 20% de los pacientes que requieren terapias alternativas, la

criopreservación es una excelente alternativa para conservar la fertilidad[30] . Al igual que con el trasplante ovarico, cabe resaltar la importancia de utilizar el modelo bovino para avanzar en la criopreservación humana, dadas las similitudes anatómicas ntre ambas especies.

La criopreservación también es una técnica aplicable a mujeres sanas, pero que quieren tener hijos a una mayor edad, y que en espera del momento adecuado, pueden conservar sus ovarios en un estado de vitalidad y actividad ideal para luego ser reimplantados[30]. Aunque las razones éticas de esto se discuten aun, esta técnica es muy útil en países desarrollados en los cuales un gran número de mujeres posponen la maternidad por diferentes razones.

4.3 Procedimientos previos

4.3.1 Anestesia en rumiantes

Los rumiantes pueden ser anestesiados con seguridad en un ambiente de campo. El más alto nivel de la analgesia proporcionada por la anestesia elimina la necesidad para el bloqueo anestésico local, que puede resultar útil cuando se espera que un procedimiento produzca un nivel sustancial de dolor o el bloqueo anestésico local no sea viable. Ciertos aspectos de la anestesia le dan al paciente un riesgo mayor que las técnicas de inmovilización química. El conocimiento y la vigilancia reducen los riesgos adicionales asociados con la anestesia [31, 32].

4.3.2 Consideraciones pre-anestésicas

.4.3.2.1. Examen Físico

Un examen físico se debe realizar, incluyendo una evaluación global de del paciente el estado de salud, la auscultación de los sistemas cardiopulmonar y

evaluación de la función del aparato locomotor. Este examen ayuda a determinar si el paciente es un candidato adecuado para la anestesia de campo y puede reducir la responsabilidad en caso de que se presenten complicaciones en la .anestesia [31.]

4.3.2.2 Selección del sitio

Es muy importante seleccionar un sitio que esté tranquilo y libre de distracciones. La sedación producida por los agonistas α2-adrenérgicos se puede opacar por elevada actividad simpática de los pacientes con ansiedad o euforia. Esto ocurre especialmente cuando se administran dosis bajas de medicamentos de sedación [32].

Debe ser seleccionado una superficie plana y nivelada que proporcione un buen apoyo. Una superficie suave reduce el riesgo de lesiones. El sitio seleccionado debe estar libre de peligros. Los rumiantes grandes son más difíciles de controlar de manera física y requieren una zona de seguridad un poco más grande. Los rumiantes tienden a ser muy pacientes. Generalmente, no intentan ponerse de pie hasta que están completamente despiertos y funcionales. Una buena superficie de apoyo es el requisito principal para lograr una buena recuperación. Una zona de césped abierto es generalmente ideal. Un compartimiento con una cama profunda de viruta se puede utilizar. También se deben considerar factores como la proximidad al agua, acceso a la electricidad, vías y medios de transporte al seleccionar un sitio [31, 32].

4.3.2.3 Posicionamiento del paciente

Los rumiantes producen una importante cantidad de saliva, mientras se encuentran sedados o anestesiados. El grado de protección laríngea y los reflejos oculares dependen de la técnica de inmovilización química y las dosis de fármaco seleccionadas. Los niveles más leves de contención química proporcionan una

mayor protección de las vías respiratorias. Cuando se produce decúbito el paciente debe colocarse de tal forma que la saliva salga de la boca en vez de ir de nuevo cerca de la laringe. Para los pacientes en decúbito lateral se puede realizar esto simplemente colocando una almohadilla debajo de la unión cabeza-cuello, de manera que la abertura de la boca este por debajo del nivel de la laringe [31, 32].

La protección de las vías aéreas se hace mucho más difícil cuando el paciente se coloca en posición de decúbito dorsal. Los pequeños rumiantes cuando se colocan en posición de decúbito dorsal generalmente están bajo la influencia de un protocolo de contención química potente. El cuerpo de estos pacientes debe ser elevado con el uso de almohadillas de espuma o algún otro método con la cabeza apoyada en el suelo o en la superficie de la mesa de cirugía. Es importante que la cabeza se apoye, en lugar de colgarla para evitar una tensión excesiva en las estructuras del cuello. La cabeza y el cuello son rotados situando la apertura de la boca debajo del nivel de la laringe para facilitar la salida de saliva. El cuello corto y grueso de algunas razas de ganado pueden hacer que la orientación correcta de este sea difícil de lograr. Cuando la cabeza no se puede colocar para facilitar la salida de saliva o el procedimiento se espera que produzca una cantidad importante de sangre u otro material que podría entrar en la vía aérea del paciente debe ser intubado..Es muy difícil el posicionamiento de grandes rumiantes en decúbito dorsal para facilitar la salida de saliva en un ambiente de campo. El grado de sedación que se utilice determina la forma en la que estos pacientes son controlados. Los pacientes rumiantes más grandes son a menudo inmovilizados en posición de decúbito dorsal. La retención química reduce el nivel de angustia y estrés en estos pacientes. Los pacientes ligeramente sedados suelen ser capaces de proteger sus vías respiratorias, pero deben ser monitorizados para detectar signos de dificultad respiratoria. La sedación fuerte deprime marcadamente la tos y los reflejos de deglución, aumentando el riesgo de aspiración. Si se sospecha que un paciente rumiante de gran tamaño requiere más que una ligera sedación para tolerar la restricción en decúbito dorsal, la anestesia de campo con la intubación puede ser una mejor opción [32].

4.3.2.4. Uso de catéteres en rumiantes

Los catéteres intravenosos son costosos, de tal manera que antes de colocar un catéter se deben considerar algunos aspectos que generalmente se pasan por alto. La vena yugular es el sitio más utilizado para la colocación del catéter intravenoso, sin embargo se pueden canalizar otras venas. La piel más gruesa de los rumiantes hace que la introducción del catéter más difícil. en la mayoría de los pacientes rumiantes se puede utilizar un catéter calibre 14 , o calibre 18 en terneros. El catéter debe ser protegido en el cuello con sutura o vendaje. El catéter debe ser siempre chequeado antes de la inducción anestésica para asegurarse de que sigue siendo funcional. Las venas de la superficie externa del oído se han utilizado como un lugar alternativo para el acceso venoso en los pacientes rumiantes. Un catéter calibre 18 o 20 debe ser usado y asegurado con una combinación de pegamento y cinta adhesiva. Estos catéteres más pequeños no ofrecen la caudal del catéter de calibre 14, pero funcionan bien [31].

4.3.2.5. Intubación endo-traqueal

Los rumiantes continúan produciendo una importante cantidad de saliva mientras son anestesiados. Las técnicas de la anestesia de campo comprendidas en este artículo tienden a dejar un grado de laringe y los reflejos del ojo en su lugar, pero no deben contar para proteger las vías respiratorias. Los rumiantes anestesiados en un ambiente de campo deben colocarse de modo que se salga la saliva hacia afuera de la boca en vez de ponerla cerca de la laringe. Para los pacientes en decúbito lateral esto puede lograrse simplemente colocando un cojín bajo la unión de la cabeza y cuello para que así la apertura de la boca esté por debajo del nivel de la laringe. La protección de la vía respiratoria se hace mucho más difícil cuando el paciente se coloca en decúbito dorsal. Los pequeños rumiantes puestos en posición de decúbito dorsal están generalmente bajo la influencia de una técnica química de retención potente o anestesiada. El cuerpo de estos pacientes debe

ser lo suficientemente elevado usando almohadillas de espuma o algún otro método con la cabeza apoyada en el suelo o superficie de la mesa de la cirugía. Es importante que la cabeza este apoyada en lugar de colgarla en un espacio para evitar la excesiva tensión en las estructuras del cuello. La cabeza y el cuello se rotan para colocar la apertura de la boca debajo de la laringe para facilitar la salida de saliva. El cuello grueso y corto de muchas razas de ganado puede hacer la orientación correcta difícil de lograr. Cuando la cabeza no se puede colocar para facilitar la salida de saliva o se espera que el procedimiento produzca una cantidad significativa de sangre o de otro material que pudiera entrar en la vía aérea el paciente debería ser intubado. Muchos profesionales ofrecen una selección de pequeños tubos endotraqueales y bolsas Ambu para resucitar a pacientes jovenes Los tubos de silicona endotraqueal usados en rumiantes grandes son caros. Los profesionales de planificación para anestesiar pacientes rumiantes grandes en decúbito dorsal deben agregar una pequeña selección de los más grandes tubos endotraqueales al equipo en su vehículo. Una solución de compromiso podría ser añadir 12, 16 y 22 mm tubos endotraqueales, que proporcionan una vía adecuada para una amplia gama de tamaño del paciente. Pacientes con un peso de más de 680 kg experimentan mayor trabajo de la respiración con un tubo endotraqueal 22mm. Los pacientes deben ser desentubados con manguito inflado en posición de decúbito esternal para reducir el riesgo de aspiración. Un breve período de apnea inmediatamente después de la inducción de la anestesia con tiopental es bastante común. La depresión del sistema nervioso central (SNC) producida por el bolo tiopental eleva el punto de las vías respiratorias (el nivel de PaCO2 que inicia ventilación). El aumento de la PaCO2 durante el período de apnea, eventualmente llega al punto de nuevo, y se reanuda la ventilación espontánea. La inducción anestésica con ketamina no alterar significativamente el valor del punto respiratoria y la apnea pos inducción es poco común. La ketamina afecta el centro respiratorio. La respiración Irregular (apneustica) es bastante común inmediatamente después de la inducción de la anestesia con ketamina o Telazol en los pacientes equinos, aunque es menos frecuente en los rumiantes. La respiración Apneustica por lo general no dura

mucho y es de pocas consecuencias en pacientes de salud normales a menos que inalaciones anestesicas esten envueltas. Una válvula de 160 L / min a (JDM-5041, JD médica, Phoenix, Arizona) y el suministro de oxígeno portátil (el tanque y la presión ente regulador) se requieren para tratar la apnea prolongada. No hay sustituto para este equipo en las ocasiones raras, pueden que sea necesario, pero la justificación de los gastos y espacio, requieren variaciones de práctica a práctica. Este equipo debe ser estándar en todas las clínicas de animales grandes en los que la anestesia se le a realiza todos [31, 32]. El suplemento de oxígeno generalmente no se requiere durante la anestesia de campo a corto plazo en los rumiantes, pero en el caso de los trasplantes que se realizan en quirófano es un aspecto que se debe tener en cuenta. La entrega de oxígeno y la protección de los músculo y de nervios se deben mvigilar durante este tipo de anestesia por periodos de tiempo mayores de mdia hora [31, 32].

4.3.2.7. Ayuno antes de la anestesia

Los rumiantes deben estar en ayunas antes de la anestesia. El ayuno reduce el volumen de contenido ruminal, lo que reduce la presión sobre el diafragma y la incidencia de la regurgitación. Los rumiantes adecuadamente ayunados son menos probables a tener hinchazón durante el reposo y la anestesia. La retención de alimentos y agua durante 24 horas antes de la cirugía ha sido tradicionalmente recomendada. La experiencia con casos de emergencia de no ayunados ha demostrado la adecuada técnica para ser el factor más importante para reducir el riesgo de regurgitación durante la inducción y la intubación. El intento de intubar a un paciente con algún grado de reflejos nauseosos es más probable que resulte en la regurgitación. Una técnica adecuada para la inducción elimina el reflejo nauseoso. Manteniendo al paciente en decúbito esternal con la cabeza elevada reduce el riesgo de regurgitación pasiva durante la intubación. La retención alimentos por 12 a 18 horas (acceso al agua es permitido) ha demostrado su eficacia en la reducción de problemas durante la intubación y anestesia si bien no producen los efectos adversos sobre la motilidad del rumen y el estado ácido-base

asociados con períodos más largos de ayuno. Algunos procedimientos quirúrgicos abdominales se benefician de una mayor reducción del volumen del rumen y un largo periodo de ayuno se requiere en estos casos [31].

Los animales jóvenes tienen reservas mínimas de energía. El riesgo de hipoglucemia en estos pacientes aumenta con la duración de la anestesia. Los rumiantes lactantes son típicamente anestesiados sin ayuno para reducir el riesgo de hipoglucemia. Los rumiantes menores de 2 meses de edad deben ser complementados con dextrosa durante la anestesia. Agregando de 1,25% al 2,5% de glucosa a la vía intravenosa (IV) solución de electrolitos (10 ml / kg / h) es generalmente suficiente, para garantizar que los niveles de glucosa en sangre se mantiene en buen estado en estos pacientes. Por lo general a los 2 meses de edad los pacientes rumiantes más saludables, ya no requieren suplementos de dextrosa durante los procedimientos anestésicos más corto. Agregar 1,25% de dextrosa a los fluidos IV es un seguro barato contra la hipoglucemia en los pacientes rumiantes de 2 a 4 meses de edad cuando un largo período de la anestesia se prevé. Las temperaturas elevadas del cuerpo aumentan el metabolismo y aumentan el riesgo de hipoglucemia en los pacientes más jóvenes. Los pacientes de hasta 4 meses de edad deben ser complementadas con dextrosa cuando la temperatura corporal es significativamente elevada [31].

A menos que las pruebas se realicen durante la anestesia, la hipoglucemia no suele ser reconocido hasta el período de recuperación. La hipoglucemia produce un estado estuporoso. La administración de dextrosa ha dado lugar a una recuperación total, sin efectos adversos aparentes, cuando esto ha ocurrido. La prevención es preferible que el tratamiento. La lucha física prolongada durante retención de los pacientes jóvenes indisciplinados puede producir una elevación importante de la temperatura corporal. Pacientes insubordinados deben ser sedados en lugar de luchar. [32]

4.3.2.8 Protección para los ojos

Cuando los rumiantes son colocados en decúbito lateral se deberían adoptar cuidados para garantizar que los parpados del ojo hacia abajo están cerrados. Una toalla o una almohadilla fina se pueden poner debajo del ojo hacia abajo para proporcionar una protección adicional. Una pomada oftálmica (suave o un antibiótico) debe ser puesto en los ojos para protegerlos durante la anestesia. Si la vista hacia abajo termina bañada en la saliva o regurgitación esto debe ser enjuagado durante la recuperación [32].

4.4 Manejo de la inmunosupresión

En la actualidad, no existen datos suficientes que permitan formular recomendaciones concretas sobre la terapia inmuno-supresora en bovinos, debido a que el trasplante de cualquier órgano no es una práctica común en bovinos por razones de costo- beneficio, sino también porque la especie ovina ha sido el modelo animal elegido para el estudio de la técnica de trasplante de ovarios. En ovinos, los medicamentos inmunosupresores se utilizan en una variedad de combinaciones, y los protocolos usados exitosamente son variados al igual que las técnicas de trasplante. Entre los protocolos descritos, los más utilizados son: monoterapia con prednisolona, doble terapia con prednisolona y azatioprina, triple terapia con Prednisolona, Azatiprina y Micofenolato, y Micofenolato con microemulsiones de Ciclosporina (*Neoral TM*), o Tacrolimus [33].

La combinación más utilizada durante el primer año después del trasplante es la triple terapia con prednisolona, Azatioprina y Ciclosporina, aunque también el Tacrolimus y/o micofenolato mofetilo se están utilizando cada vez más durante los últimos años, junto con otros medicamentos más recientes, como Rapamicina [33]. La supervivencia del injerto parece ser similar con todos los regímenes de uso corriente, incluyendo los nuevos agentes, según lo han reportado los diversos autores, de tal manera que la terapia de elección en bovinos, dependerá de los costos. En cualquier caso, es importante que antes de realizarse el trasplante, se

elija previamente un protocolo de inmunosupresión, de acuerdo a la disponibilidad de los medicamentos a utilizar, ya que la aplicación de estos medicamentos de debe prolongar por un año, o al menos, hasta que haya completa adaptación del ovario nuevo en la vaca receptora, de tal manera que la disponibilidad es escencial para evitar cambios en el protocolo de inmunosupresión en el transcurso de la recuperación[33].

El retiro paulatino de los esteroides postrasplante ha sido asociado al aumento de rechazo agudo en la mayoría de los trasplantes de órganos sólidos, además, la exposición crónica a los esteroides podría resultar en una dependencia, lo que hace que su retiro sea inmunológicamente inseguro para el receptor. Existen algunas publicaciones que apoyan la suspensión precoz de los esteroides o la ausencia completa desde el inicio del trasplante, con resultados alentadores [34]. Estos esquemas pretenden inducir de manera precoz mecanismos de tolerancia inmunológica que sólo pueden desarrollarse durante el primer contacto con el injerto, postulando que los esteroides actuarían en la supresión de moléculas efectoras de células citotóxicas que involucran una respuesta inmune adaptativa, la que facilitaría la aceptación precoz del injerto [34].

La aplicación de protocolos de inmunosupresión en bovinos deberán basarse en los protocolos utilizados en ovinos, sin embargo, es imprescindible estudiar las respuestas de adaptación o rechazo usando diferentes protocolos en vacas, para poder así recomendar uno o varios protocolos de inmunosupresión teniendo en cuenta los costos del mismo [34].

4.5 Técnica de trasplante de ovarios

El trasplante de órganos ha sido una herramienta importante en las últimas décadas, y el trasplante de ovarios en particular, permite a los pacientes con enfermedades que causan infertilidad, tener una vida reproductiva normal al recibir un ovario sano. Aunque se ha buscado la forma de atraer donadores potenciales,

esto no ha sido suficiente ya que diariamente las listas de espera se incrementen y los donantes no son suficientes para suplir la falta de órganos, por lo cual sólo un pequeño porcentaje de pacientes se pueden ver beneficiados [35, 36, 37].

Existen varios tipos de trasplante ovárico según el origen del injerto implantado en el receptor: el autotrasplante se realiza utilizando injertos del mismo individuo, el alotrasplante utiliza injertos de la misma especie entre dos individuos, y el xenotrasplante utiliza injertos de diferente especie. A su vez, existen múltiples variaciones de estas técnicas de trasplantes [37].

En los casos del alotrasplante y xenotrasplante, el problema que se presenta frecuentemente entre donante y receptor es la activación de la respuesta inmune contra los órganos implantados, desencadenando una reacción inflamatoria conocida como rechazo [38]. Aunque el autotrasplante no presenta este inconveniente, la dificultad radica en que no siempre es posible obtener un órgano sano en este tipo de pacientes que por algún problema de salud deben ser sometidos al trasplante [37].

4.5.1 Autotrasplante

La técnica de autotrasplante se ha realizado de diversas maneras; Taya et al., (1985), realizaron un trasplante de ovario en bovinos en la región del cuello, implantando el ovario extraído debajo de la piel. Los investigadores utilizaron 4 vacas de la raza Negro Japonesa las cuales fueron ovariectomizadas. Se vitrificó el tejido ovárico de los ocho ovarios por el método Cryotissue [24]. Se tomaron muestras de sangre cada 2 semanas después de haber sido ovariectomizadas, para verificar el cese de la función ovárica. Una vez se aseguraron que no había ciclicidad ovárica, el tejido vitrificado se trasplanto bajo la piel del cuello de cada vaca. Dos meses después del autotrasplante, cada animal recibió una dosis de 500 UI de ECG. Luego se tomaron muestras de sangre cada dos semanas

después del trasplante para evaluar la recuperación ovárica. Se midió la concentración sérica de estradiol por medio de radioinmunoensayo. [24]

Kagawa el al., (2009) realizaron un autotrasplante de tejido ovárico vitrificado de manera experimental en la especie bovina. Los autores describen esta técnica en dos vacas de la raza Negro Japonesa de 59,8 meses de edad y 490-665 kg de peso. Las vacas fueron sometidas a dos cirugías bajo anestesia epidural con Lidocaína HC1 (*Xylocaine solución, AstraZeneca,* Londres) a una dosis de 0,17 ml/10 g de peso corporal. Durante la primera cirugía, cada ovario fue extraido y se obtuvieron secciones de 1×10×10 mm. El tejido fue inmediatamente vitrificado, utilizando la técnica Cryotissue ya descrita, y se almacenó a -196 ° C en nitrógeno. y luego la corteza del ovario izquierdo se suturó en el sitio original (ortotópico) con prolene 9-0 y lo mismo se realizó con el ovario derecho. Un total de cuatro piezas de tejido ovárico que fueron vitrificadas y luego de ser calentadas fueron trasplantados (dos piezas por vaca). Posteriormente, los injertos de ovarios fueron removidos 44 días después del autotrasplante para realizar un análisis histológico, para lo cual fueron lavados con D-PBS, fijados en formalina 10% tamponada con fosfato, a pH 7,4 (*Wako*), y sometidos a deshidratación convencional para realizar luego cortes de 3 micras de espesor y tinción con hematoxilia-eosina. Finalmente, Se contaron los folículos presentes en el área del injerto [24].

Jeremías y col. (2002) describieron por primera vez el método de trasplante ortotópico en una oveja adulta, con anastomosis del pedículo vascular. Los autores realizaron autotrasplante de ovarios frescos en la pared abdominal através de la reanastomosis de los vasos ováricos con los vasos epigástricos, después de lo cual los ovarios recuperaron su función endocrina [39].

En otro estudio, se realizó autotrasplante de ovarios criopreservados durante dos meses en ovejas. La intervención se llevó a cabo por laparotomía media bajo anestesia general.[39] La técnica se describe de la siguiente manera:

El injerto se realiza a nivel de la arteria ovárica del pedículo vascular contralateral por medio de laparotomía. Después de la descongelación, los ovarios se lavan para eliminar los crioprotectores, bajo el microscopio, a través de la arteria ovárica con 10 mL de medio suplementado con 0,5 M de sacarosa y 10 UI / mL heparina. Luego, los ovarios se perfunden con 10 ml de solución fría de UW con 10 UI / mL de heparina. El trasplante de ovario se realiza mediante anastomosis término-terminal de la arteria y la vena ovárica con suturas 10-0 interrumpidas (*Ethicon, Johnson y Johnson, Somerville, NJ*), utilizando un microscopio quirúrgico (*Zeiss, OP-Mi6, Oberkochen, Alemania*). Una vez concluida la anastomosis arterial y venosa, el ovario restante se elimina. El flujo sanguíneo se verifica mediante la pulsación de la arteria ovárica y la distensión normal de la vena ovárica. Para reducir el riesgo de adherencias, se aplica en el ovario injertado un gel que contiene ácido hialurónico (*Intergel, Johnson & Johnson*), antes del cierre de la pared abdominal.

Jeremias y con han demostraron por medio de esta técnica que la re-anastomosis de los ovarios descongelados fue un éxito en cinco de los ocho ovinos (62,5%) en los cuales se realizó el trabajo experimental; y aunque los cirujanos encontraron en tres animales fallas en la re-perfusión, pudieron concluir que su falla luego de la anastomosis se debió a una trombosis venosa en uno de los casos, a la ruptura de la arteria en otro, y en los restantes se dedió a razones desconocidas. La anastomosis arterial llevó más tiempo (61+/- 25 minutos) que la venosa (42+/-8 minutos) debido al pequeño diámetro de la arteria ovárica (Alrededor de 1 mm), sin embargo, el tiempo necesario para completarla se redujo en un 50% con experiencia en el tiempo. La laparotomía, realizada dos meses después del autotrasplante exitoso (N 5), reveló adherencias graves en todo el ovario trasplantado en una oveja, adherencias leves en tres , y no adherencias en una de las hembras. Semanalmente, se tomaron muestras de los niveles de P, 6 meses después del trasplante, para evaluar la actividad ovárica. Tres de las ocho ovejas trasplantadas mostraron ciclicidad normal P(37,5%). Adicionalmente, los autores

encontraron unos niveles normales de progesterona en los animales del estudio, a pesar de las adherencias post-quirúrgicas [39].

Los estudios de la técnica de trasplante ovárico en animales alentaron a algunos médicos a practicarlo en mujeres con problemas reproductivos, como una esperanza de recuperar la fertilidad. Se tomaron en cuenta las experiencias exitosas de trasplante en la especie ovina principalmente como modelo animal para realizar la técnica en humanos [40].

4.5.2 Alotrasplante

El alotrasplante es la técnica mediante la cual se practica un injerto de tejido o un trasplante de órgano entre animales de la misma especie, genéticamente diferentes [41]. Este puede estar acompañado de terapias inmunosupresoras, para lograr mejores resultados de implantación y reducir las reacciones de rechazo histológico [42]. ; La técnica de Alotrasplante ovárico, ha sido desarrollada con éxito en algunas especies animales, principalmente en conejos, modelo animal utilizado por razones prácticas en investigación, y los avances han permitido que esta técnica se practique en el hombre, luego de lo cual se ha logrado obtener exitosamente la reanudación de la ciclicidad ovárica, preñeces y nacimientos satisfactorios [21, 22, 23].

El éxito del Alotrasplante de ovario, está determinado en gran parte a factores como la consecución de donantes y receptores apropiados, la recuperación de la perfusión tisular del injerto, la calidad de la intervención quirúrgica y la organización en dos equipos de trabajo quirúrgico, uno que se encarga de la consecución del injerto en el donante y el otro del implante y re perfusión del órgano o tejido trasplantado en el receptor [21].

La técnica de Alotrasplante ovárico es útil para recuperar la disposición funcional y anatómica en conejos utilizando la técnica de microcirugía vascular acompañada de un protocolo de inmunosupresión con Ciclosporina para restablecer la función endocrina del ovario y su fertilidad [21]. Meraz (2008) describe en su técnica los procedimientos realizados bajo anestesia general, en la cual los animales fueron sometidos a una terapia postquirúrgica analgésica y antimicrobiana, para evitar cualquier complicación en el periodo postoperatorio [43].

La técnica desarrollada por Manuel M. Meraz para realizar el alotrasplante de trompas y ovarios en conejos ha sido validada como una técnica útil para recuperar la disposición funcional-anatómica en conejos y para restablecer la función endocrina del ovario y su fertilidad, mediante microcirugía vascular, de una manera segura y rápida, la cual ha sido una técnica de referencia para los hospitales especializados y centros médicos en todo el mundo donde se realizan trasplantes de trompas- ovarios en mujeres [44].

En el año 2004, un equipo médico del Seth G. S. Medical College en Monbai, India, realizó trasplante de ovarios a dos mujeres por medio de dos métodos diferentes: el método vascular y el método avascular. Este procedimiento fueron todo un hito, pues el modelo permitió la comparación de los dos métodos mencionados. El trasplante se practicó a dos jóvenes de 15 y 17 años de edad con síndrome de Turner. Ambas pacientes presentaban amenorrea primaria, baja estatura, y ausencia de caracteres sexuales secundarios. Por medio de la técnica de fluorescencia de hibridación in situ (FISH) se reveló un patrón de 45 XO. Se practicó una la laparoscopia diagnóstica la cual reveló gónadas bilaterales subdesarrolladas, útero más pequeño del tamaño normal, y trompas de Falopio normales. La compatibilidad inmunológica entre donantes y receptores fue realizada por medio de pruebas de compatibilidad de grupo sanguíneo ABO, antígeno de histocompatibilidad (HLA) de tipos de tejidos y pruebas de reacción cruzada de linfocitos; esta última prueba se repitió una vez más antes de la operación [40].

El trasplante ovárico ortotópico vascular se practicó en la paciente de 15 años. La donante fue una hermana de la paciente de 26 años de edad con dos hijos, a quien se le practicó cirugía de ligadura de trompas con el fin de planificar. Después del éxito de esta cirugía, numerosos cirujanos han tomado esta técnica como modelo, por su simplicidad. La técnica se describe a continuación:

Bajo anestesia general, se accedió a la cavidad abdominal mediante una incisión de *Pfannenstiel*. Se realizó una disección extraperitoneal para identificar un pedículo vascular largo. La vena ovárica de 4 mm de diámetro, fue separado de las demás venas que lo rodeaban. La arteria ovárica también fue identificada y separada. La trompa de Falopio se separó del ovario por medio de un nudo realizado con seda negro 4-0. El pedículo utero-ovarico se disecó sin clampear. En ese momento el cirugía en el receptor. Después de completar la disección vascular del receptor, el donante recibió 10.000 UI de heparina por vía intravenosa. El pedículo del ovario fue fijado lateralmente dejando 6 pulgadas de longitud del pedículo vascular. Después de haber cortado la ligadura medial del ovario, este se sumergió en 4 ° C solución salina fría heparinizada y lavada con solución de Ringer a 4 ° C a través la arteria ovárica en sentido anterógrado y retrógrado para eliminar todos los elementos de la sangre. La inmunosupresión del destinatario se inició con metilprednisolona (500 mg en bolo IV) en el momento de la inducción de la anestesia. El abdomen se realizó una incisión en el lado derecho del abdomen en forma de J invertida, paralela al ligamento inguinal derecho. Los vasos epigástricos inferiores fueron identificados y disecados, pero no se clampearon. El ligamento redondo fue identificado en su curso extraperitoneal y mantuvo intacto. La vena ilíaca externa se disecó y se aisló por completo de los vasos que la rodeaban. Se le suministró heparina (10.000 UI) por vía intravenosa antes de la fijación de la vena ilíaca externa. Se suturó la parte terminal de la vena ovárica a la parte lateral de la vena ilíaca externa utilizando sutura continua con prolene de 8-0. La arteria ovárica se suturó a la arteria epigástrica inferior utilizando puntos separados con prolene 10-0. El peritoneo se despejó y el ovario de la donante se colocó ortotópicamente y se fijó con múltiples puntos de sutura

vicryl 3-0 en el ligamento redondo y el peritoneo. La inmunosupresión se logró con ciclosporina y prednisolona. La ciclosporina oral (4 mg/kg /peso corporal) se inició a partir del día 2 en dosis divididas. La metilprednisolona de 250 mg se administró por dos días y luego se administró prednisolona oral durante 5 días a una dosis de a una dosis de 2 mg/kg de peso corporal y posteriormente a una dosis de 0,5 mg/kg de peso corporal para los 10 días siguientes. Posteriormente, la prednisolona se redujo a una dosis de mantenimiento de 0,2 mg / kg de peso corporal. El fenómeno de rechazo fue supervisado por la medición y la relación de USG, CSC, ESR, CD4-CD8, y por seguimiento con Doppler. Tanto el receptor como el donante tuvieron una buena recuperación [40]. El seguimiento de la función del ovario trasplantado fue realizado por medio de la evaluación de la función hormonal, producción folicular, y del flujo vascular. El estradiol sérico se midió en serie, y esta mostró un aumento cíclico (de menos de 20 pg / ml a 147 pg / ml). La producción folicular se observó desde el primer mes posoperatorio y fue monitoreado en los siguientes ciclos estrales. El primer año de seguimiento mostró nueve ciclos menstruales espontáneos, siete ovulaciones, y desarrollo de caracteres sexuales secundarios. La resonancia magnética (MRI) realizada al final del primer y del segundo año mostró un útero desarrollado con función endometrial, y función normal del ovario trasplantado. A los dos años y medio, la paciente tuvo una menstruación espontánea con ovulación, y excelente manifestación de los caracteres sexuales secundarios que le permitieron llevar una vida reproductiva normal. La mujer manifestó que se siente como una mujer completa psicológicamente [40].

Demeestere I. y col (2009), realizaron también el trasplante ortotópico vascular en humanos, y concluyeron que el trasplante ovárico con anastomosis vascular permite una inmediata revascularización de la corteza ovárica, reduciendo significativamente los daños por isquemia del ovario, sin embargo, esta técnica es más difícil y requiere más habilidad por parte del cirujano [45] .

Se ha realizado trasplante ovárico con anastomosis vascular de forma exitosa usando la arteria ovárica, las venas epigástricas inferiores, la arteria carótida y la arteria iliaca en varias especies [45].

Las particularidades anatómicas vasculares en el ovario plantean un enorme desafío para el cirujano de trasplantes. La presencia de solo una gran vena de drenaje es importante para la anastomosis vascular y la viabilidad del trasplante ovario. En un número considerable de casos anteriormente descritos, las venas fueron sustituidas por una malla de las vénulas pequeñas, haciendo que la anastomosis vascular fuera una tarea imposible quirúrgicamente, además de aumentar el riesgo de trombosis venosa. Teniendo en cuenta estos antecedentes, los cirujanos plantearon realizar una técnica avascular [45].

El trasplante ortotópico avascular se llevó a cabo en una paciente, de 17 años de edad, quien recibió un ovario de la madre de 38 años; la técnica se describe a continuación:
Bajo anestesia regional, se accedió a la cavidad abdominal de la donante mediante una incisión de Pfannenstiel con disección extraperitoneal. El pedículo del ovario se identificó y se disecó para revelar el gran plexo venoso que rodea la arteria ovárica. El ovario y su gran pedículo vascular fueron removidos y disecados con la ayuda de un microscopio quirúrgico. Antes de la extirpación ovárica al donante se le dio 10.000 UI de heparina por vía intravenosa. Aquí no existía una única vena ovárica sino un conjunto de múltiples vénulas pequeñas; debido a la imposibilidad de obtener un único drenaje venoso, se tomó la decisión de hacer un trasplante avascular ortotópico. El ovario se colocó en 4° C una solución salina fría heparinizada y se lavó con una solución de 4° C de Ringer en sentido anterógrado y retrógrado a través de la arteria ovárica a través de la vena ovárica para eliminar todos los componentes de la sangre. El ovario se dividió en cuatro injertos iguales. Cada injerto se dividió en tiras de 0,5 cm en forma de abanico. Dos de dichos injertos fueron suturados en Surgicel con sutura vicryl 4-0. Se cree que las franjas de corteza ovárica aumentan la posibilidad de neoangiogénesis y la absorción del

injerto. Bajo anestesia general, se accedió al abdomen del receptor a través de una incisión de Pfannenstiel. El útero, las trompas de Falopio, y las gónadas fueron identificados. La fosa ovárica fue disecada y dos injertos de ovario en forma de abanico en Surgicel se colocaron ortotópicamente entre las gónadas y el útero. Los injertos fueron fijados con suturas de vicryl 4-0. El ligamento ancho se incidió entre la trompa de Falopio y el ligamento redondo. Los otros dos injertos fueron colocados a ambos lados del ligamento ancho y se suturaron. El abdomen se cerró por planos. La inmunosupresión Utilizada consistió en un régimen de dos fármacos: ciclosporina y prednisolona. El fenómeno de rechazo fue supervisado mediante el conteo y la relación USG, el poder-angio, MRI, CBC, ESR, CD4-CD8. Las pruebas de USG realizadas en los días 7 y 15 mostraron una excelente adaptación del injerto, y específicamente el del ovario izquierdo mostró el desarrollo de pequeñas folículos. No hubo signos de rechazo de tejidos en el injerto. En el decimoquinto día se observó vascularización temprana y desarrollo de folículos pequeños en el injerto de ovario izquierdo. El ultrasonido en 3-D realizado un mes después de la cirugía mostró evidencia de neovascularización. El injerto del ovario izquierdo mostró múltiples folículos ováricos pequeños. No hubo signos de rechazo. Las determinaciones seriadas de estradiol sérico mostraron un aumento significativo de 20 pg/ml a más de 50 pg / ml [41].

Los resultados tanto del trasplante vascular como avascular fueron alentadores, ya que ambas pacientes recuperaron su función ovárica, lo cual dio pie a que muchos clínicos intentaran realizar el trasplante en mujeres con diferentes problemas de infertilidad. Entre los procedimientos con la técnica de trasplante ortotópico avascular, se reportaron los siguientes casos: Castellenos aplicó el método de injerto de ovario a seis pacientes con el síndrome de Turner, Hanon también realizó trasplante en una mujer igualmente con Síndrome de Turner, Desaire realizó trasplante de ovarios en mujeres que habían sido castradas después de quimioterapia para tratar cáncer de bazo, Holmer realizó trasplante de ovario en pacientes con agenesia gonadal, y Chow practicó en 1982 un trasplante de ovario en el triángulo femoral de un paciente de síndrome de Turner. No todos estos

intentos fueron exitosos, de tal manera que los procedimientos de trasplante avascular se siguen practicando en ovinos con fines investigativos, con el fin de usar esta especie como modelo animal para estudiar las causas de fracaso del trasplante ovárico avascular [40].

Parece contradictorio pero en el caso del trasplante vascular, el éxito se debió a la presencia de una gran vena ovárica, mientras que en el caso de transplante avascular, el resultado de la cirugía en los casos exitosos se debió, precisamente, a la ausencia de una vena grande de drenaje [40].

Según los resultados de las dos técnicas quirúrgicas, la técnica quirúrgica vascular con inmunosupresión proporciona evidencia clínica de la supervivencia del injerto, y la colocación ortotópica de un injerto no sólo asegura la función hormonal sino también la fertilidad natural. Los cirujanos argumentan que la preservación de una pedículo ovárico largo permite la anastomosis vascular en el sitio deseado y representa mejor la colocación ortotópica, y que el uso de Prolene 8-0 y 10-0 material como material de sutura junto con el microscopio quirúrgico también permitió en gran parte realizar la anastomosis vasculares éxito [40].

4.5.3 Xenotrasplante

El xenotrasplante es el trasplante de órganos, tejidos o células a través de una especie barrera, o entre dos especies diferentes, es decir, la implantación de órganos de animales en el hombre. Esta técnica se desarrolló por la dificultad de obtener órganos de donante humano en la actualidad, pues las listas de espera crecen de forma progresiva y el número de pacientes que mueren esperando un órgano que nunca llega aumenta cada vez más [40].

Numerosos estudios han demostrado que los xenotransplantes de tejido ovárico de una serie de especies pueden producir folículos antrales que contengan ovocitos [46].Es claro que los ovocitos derivados de tales tejidos transplantados de ovario tienen el potencial de dar lugar a la vida. El xenotrasplante es entonces una herramienta valiosa de la biología reproductiva y de la conservación de las especies animales [41].

A nivel mundial, los bancos de genes se han establecido para almacenar los tejidos reproductivos y las células recogidas a partir de especies silvestres amenazadas. Sin embargo, para ser de potencial empleo, diversos métodos son necesarios para la utilización de dichos materiales. El xenotrasplante de ovario es una valiosa herramienta que permite la generación de oocitos maduros a partir de tejido ovarico de las especies silvestres en peligro de extinción. Los oocitos recolectados a partir de injertos pueden ser utilizados en la FIV(Fecundación in vitro) o ICSI (Inseminación intracitoplasmatica) para producir descendencia. El tejido ovárico se puede recoger de las hembras independientemente de su edad, ciclo reproductivo e incluso después de la muerte, y esto es una gran ventaja, en comparación con la conservación de oocitos y embriones maduros. Estos factores hacen del xenotrasplante de ovario una atractiva tecnología de reproducción asistida para su uso en la preservación de la vida silvestre en peligro de extinción.
Durante la última década, a través de la utilización de receptores inmunodeficientes como los SCID, NOD / SCID y ratones nock out, numerosos trabajos han analizado la aplicabilidad de los xenotrasplantes de ovario en el campo de la biología reproductiva. Algunos estudios han demostrado que en este modelo es posible lograr un desarrollo folicular después de haber realizado xenotrasplantes de ovarios congelados y o frescos en las especies marsupiales, euterias, y también en la humana. Independientemente de las diferencias entre especies, el medio ambiente hormonal del destinatario permite reanudar la función y desarrollo folicular del tejido ovárico xenotransplantado, obteniendo folículos antrales de tamaño normal en una amplia gama de especies, como en los wombat, canguros, elefantes, mono tití, vacas, gatos y humanos [18].

En los últimos años, se han recuperado con éxito oocitos de ovarios trasplantados en canguros, vacas, ratones y primates [18].

El potencial de los xenotrasplantes de ovario se ha reiterado recientemente, por el hecho que pueden producirse crías saludables a partir de oocitos madurados después de un xenoinjerto. Paris y col, realizaron un xenotrasplante de tejido ovárico a la cápsula del riñón de ratas ovariectomizadas bilateralmente. Luego de la colección de oocitos, estos fueron sometidos a una maduración in vitro de un día para otro, y fertilizados in vitro. Como resultado, se obtuvieron embriones de dos células que fueron transferidos a las madres de crianza, las cuales posteriormente produjeron crías vivas y sanas [18].

Una de las principales preocupaciones del injerto de tejido ovárico entre las especies es la transmisión de enfermedades infecciosas del donante al receptor, y viceversa. La transferencia de la infección o la enfermedad es un problema si el tejido ovárico se va a utilizar para el injerto (autoinjerto o aloinjerto) con el objetivo de generar crías vivas. En un estudio realizado por Shaw et al., ratones sanos receptores desarrollaron cáncer tras recibir un aloinjerto con tejido de ovario de ratones donantes con linfoma. En el xenoinjerto de tejido ovárico, la preocupación por la transmisión de zoonosis (por ejemplo, los retrovirus, priones) constituye un riesgo importante. La capacidad de los retrovirus de ser incorporados en la línea germinal de una especie tiene graves repercusiones, no sólo en los humanos, sino también en los animales en peligro de extinción, y puede causar el efecto contrario al buscado, ya que esto puede representar una mayor amenaza para la conservación de la población en general [18].

El xenotrasplante de tejido ovárico en ratas inmunodeficientes es una estrategia que se ha utilizado para estudiar el desarrollo folicular in vivo. Además de proporcionar una valiosa herramienta de investigación, se especula que el xenotrasplante de ovario podría ser utilizado para la producción de oocitos

fecundables. Aunque las condiciones del xenotrasplante de tejido ovárico todavía no se han optimizado, y se plantean muchos cuestionamientos éticos y fisiológicos al respecto, el xenotrasplante de ovario sigue siendo un método prometedor para la maduración de oocitos para su uso posterior, tanto en la reproducción humana como para la conservación de especies silvestres en peligro de extinción [18].

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre los tejidos congelados han utilizado injertos como una herramienta para medir la supervivencia del tejido. Cuando el tejido ovárico fresco o congelado está lesionado, la congelación no exacerba este daño. En este caso, los folículos ováricos experimentan privación oxígeno (isquemia), por lo tanto, una proporción de la población de folículos muere. En la actualidad, esta pérdida no se puede evitar, ya que los protocolos de criopreservación no son adecuados para grandes piezas de tejido. Los tejidos ovaricos son habitualmente congelados en capas delgadas o en cubos de tejido, ya que existe un equilibrio entre el tiempo suficiente para la penetración del crioprotector en el tejido y los efectos tóxicos de los crioprotectores en los oocitos [18]. Recientemente se ha informado que, en las ratas, una porción del útero, el oviducto y el ovario pueden ser congelados de manera conjunta y posteriormente lograr reanastomosis del implante en el receptor. Luego de este procedimiento, es posible recuperar completamente la función reproductiva de tal manera que las hembras pueden tener preñeces posteriores. Uno de los retos ahora es aplicar esta técnica con éxito en especies en las que los ovarios son más grandes y más fibrosos [18].

4.6 Procedimientos posteriores al trasplante de ovario.

Los procedimientos recomendados posteriores al trasplante de ovario son: la evaluación del flujo sanguíneo del ovario trasplantado, posterior a esto se puede realizar aspiración folicular, buscando la obtención de oocitos viables con morfología normal como lo reportaron Zohar y colaboradores en el 2007, un tercer procedimiento comprende en la medición hormonal de progesterona en suero

sanguíneo para la evaluación de la ciclicidad ovárica normal [3] y finalmente se puede realizar exámenes histológicos de tejido trasplantado [47]. Con los anteriores procedimientos se logrará, evaluar la integridad y viabilidad del tejido trasplantado [47].

La aspiración folicular consiste en la recolección de oocitos proveniente tanto de animales vivos desde temprana edad como hasta momentos post-mortem, para así incrementar el número de embriones de alto potencial genético y de terneros producidos por donadora/año; además, permite la disminución del intervalo generacional y aumentar la productividad, tanto en ganado de leche, doble propósito y carne [48].

Este procedimiento se puede realizar durante todos los estados del ciclo estral, durante el primer trimestre de gestación, en animales jóvenes y en estadios tempranos *post-mortem*, se puede realizar una o dos veces a la semana durante períodos de 3 a 6 meses[49].

Para preparar los animales para la aspiración, las vacas son sedadas. El recto es relajado y se realiza anestesia epidural para prevenir las contracciones abdominales y así facilitar la manipulación de los ovarios. Se vacía el recto y se limpia la región perineal. Para la técnica se utiliza una aguja conectada a una bomba de vacío que es introducida por vía vaginal. Se hace manipulación rectal de los ovarios, se visualizan los folículos y una vez localizados, la aguja atraviesa la pared vaginal y se recoge el aspirado folicular en tubos que contengan el medio de cultivo. En cada pasaje de la aguja se punciona solamente un folículo [50,51].

La aspiración de folículos se puede realizar una vez por semana. Se han visto mejores resultados cuando se realizan aspiraciones más frecuentemente en un mismo individuo [49].

4.7 Respuestas adaptativas al trasplante

Es posible que la técnica de trasplante ovárico como tal sea todo un éxito, sin embargo, la recuperación de la función ovárica o el no rechazo del ovario trasplantado determinan el éxito del procedimiento, de tal manera que frecuentemente, estas respuestas de rechazo o de readaptación son los limitantes más importantes para realizar este procedimiento. Numerosos estudios se han realizado buscando solucionar estos problemas que se presentan en el periodo posquirúrgico, en cuanto a de la recuperación de la función reproductiva y del la respuesta inmune al ovario trasplantado.

4.8 Monitoreo en el período post-quirúrgico

Arav A y col (Israel, 2010) realizaron un estudio experimental en el cual pudieron hacer el seguimiento de la función ovárica durante 6 años posteriores al trasplante de un ovario crio preservado en ovejas. En este estudio, se utilizaron 3 ovejas de 9 meses de edad. La cirugía se realizó bajo anestesia general por medio de laparotomía medial como se describe a continuación:

Se aisló el pedículo vascular del ovario derecho mediante disección, cerca al origen de la arteria ovárica bajo un microscopio de disección, y se perfundió con de solución University of Wisconsin a 4 °C, suplemeda con 10% de DMSO por 3 min. Luego se colocó en el mismo medio crioprotector (*Manara Industries, Kibuts Manara, Israel*). Las muestras fueron congeladas con un aparato de congelación multi termal de gradiente (MTG), luego fueron sometidas a un gradiente termino a un ritmo muy lento (0,01 mm / s), dando lugar a una velocidad de enfriamiento de 0,3 º C / min, posterior a esto la muestra fue sumergída a nitrógeno liquido. Luego se procedió a la descongelación, la cual comenzó la segunda semana después del trasplante y prosiguió durante dos meses. Esta se realizó mediante la emersión de los tubos contenedores del tejido en agua a 68°c durante 20 segundos, y luego en agua a 37°c durante 2 min. Para la reimplantación del ovario, la arteria ovárica fue canalizada para enjuagar la solución crio protectora mediante 10 ml de medio HEPES-TALP suplementada con 0,5 mol / l de sacarosa y 10 UI / ml de heparina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) a 38 º C. Posteriormente,

los ovarios fueron re-trasplantados ortotópicamente, se realizó re-anastomosis vascular microscópica (*10-0 puntos separados, Ethilon; Johnson y Johnson, New Brunswick, NJ, EE.UU.*) a nivel del pedículo vascular del ovario contralateral después de realizar su extirpación. El flujo sanguíneo se verificó por la observación de las pulsaciones en la arteria ovárica y el retorno venoso fue confirmada por la distensión normal del la vena ovárica (según la técnica de Revel et al.2008). Para la evaluación de la actividad endocrina de los ovarios, se midieron las concentraciones de progesterona durante 5 semanas, para esto se tomaron muestras de sangre dos veces por semana; se obtuvieron concentraciones de progesterona de más de 1 ng/ml, lo cual se consideró como prueba de un cuerpo lúteo funcional [3].

En otro estudio Hancke K y col. (2009) evaluó la preservación de la fertilidad en ovejas luego del trasplante de ovario y la esfingosina-1-fosfato como agente para evitar la pérdida folicular por apoptosis después del trasplante de ovarios. En esta investigación se utilizaron 4 ovejas de 18 meses con fertilidad normal. Una vez se comprobaron su normal fertilidad durante la temporada reproductiva anterior al procedimiento, las ovejas fueron sometidas a una laparotomía medial ventral, bajo anestesia general y se realizo ooforectomía bilateral. Los ovarios de dos ovejas se mantuvieron en una solución de conservación de 400 mM S1P (*BIOMOL, Hamburgo, Alemania*), elaborado en PET como un vehículo (*PET: 5% de polietilenglicol, un 2,5% etanol, y el 0,8% de Tween-80*), el cual se inyectó por debajo de la corteza, y luego se realizó una disección de un fragmento de 1 cm de grosor y 5*5 mm^2, el cual se incubó en 3 ml de solución madre de 400 mM S1P en PET para 3 min. Posteriormente, los fragmentos fueron transplantados en la pared abdominal, suturándose con monocryl 4-0 suturandolos por debajo de la fascia abdominal de los músculos recto abdominal; todos los fragmentos fueron trasplantados excepto uno, el cual fue fijado en formol tamponado para ser utilizado como control. Dos semanas después del procedimiento, los ovinos fueron sacrificados con tiopental, y se les practicó una laparotomía medial ventral para

remover los injertos para ser fijados en formaldehido tamponado. Se realizaron cortes para ser sometidos a la tinción de hematoxilina eosina y su posterior análisis morfólogico, con el fin de analizar la densidad folicular. Desafortunadamente se observó apoptosis terminal. Se concluye entonces que la esfingosina-1-fosfato no es un preservante efectivo que evita la apoptosis del tejido ovárico, de tal manera que las investigaciones sobre el uso de otras soluciones que prevengan la apoptosis y el rechazo inmune continúan [25].

Scaramuzzi y col (2010), evaluaron la captación de glucosa y la producción de lactato en ovejas a las cuales se les practicó autotrasplante durante la reanudación de los ciclos estrales. Los resultados de este estudio demostraron que hubo una eficiente remoción de glucosa sanguínea al pasar por la circulación ovárica, y que la diferencia de la concentración de glucosa arterio-venosa detectada se debió a un consumo energético por parte de las células ováricas activas nuevamente, pues el consumo de glucosa calculado fue 3.0 mg/dL. Adicionalmente, se reportó una diferencia significativa entre la concentración de lactato arterial y venosa, en particular, durante la fase lútea del ciclo estral. Se ha reportado que las células de la granulosa producen lactato, y esta puede incrementar durante la fase luteinica del ciclo estral. Lo anterior es determinante ya que se conoce que la producción ovárica de lactato puede ser incrementada por las gonadotropinas. Lo anterior corrobora que la reanudación de la actividad ovárica se restablece completamente después de un trasplante, y que el ovario recupera tanto su capacidad endocrina como su actividad metabólica [52].

4.9 Criopreservación de ovarios

El desarrollo de la criobiología en los últimos años ha aportado conocimientos y herramientas de gran utilidad para desarrollar y mejorar la preservación de tejidos. Mediante esta técnica, los tejidos se conservan por largos periodos de tiempo sin que se vea afectada su funcionalidad [20].. Por su parte, la vitrificación, ha permitido

el desarrollo la criopreservación de oocitos inmaduros, los cuales se pueden cosechar in vitro para lograr su maduración [33, 30]

Hasta hace poco, el almacenamiento y criopreservación de oocitos eran el gran objetivo de la criopreservación, sin embargo, estos han sido procesos más complejos incluso que los mismos procedimientos realizados con embriones. Los oocitos son extremadamente sensibles a la temperatura, y se ha descrito que puede presentarse algunos cambios degenerativos como: despolimerización de los microtúbulos del huso debido al uso de crioprotectores, formación de cristales de hielo por la congelación y descongelación, y separación anormal de las cromátidas induciendo a aneuploidias. Las dificultades técnicas de los procedimientos de congelación parecen ser la causa del bajo número de preñeces posterior a la criopreservación de oocitos [53]. Por lo anterior, se especula que el trasplante y la vitrificación de tejido ovárico jugarán un papel muy importante en los avances de la ciencia médica reproductiva, en vista que se ha demostrado el buen resultado obtenido con estas técnicas [24].

Los cambios en el tejido ovárico criopreservado se han estudiado ampliamente, y en la actualidad, se conocen los cambios degenerativos de los tejidos sometidos a preservación. En los tejidos preservados, el descenso térmico induce el cambio del agua del estado líquido al sólido-cristalino, y al mismo tiempo inhibe el metabolismo celular. El hielo es un solvente prácticamente nulo, por lo cual (al momento del crecimiento del frente sólido cristalino) los solutos del medio se desplazan y concentran en el compartimiento líquido del sistema. La hiperosmolaridad resultante de esta fracción líquida del espacio extracelular determina un fenómeno de deshidratación celular a través de un fenómeno de osmosis pasiva. Es así como la pérdida del balance osmótico resultante determina sufrimiento y muerte celular por alteración de los equilibrios iónicos, con la consiguiente desestabilización de las proteínas celulares y pérdida definitiva de la funcionalidad estéreo-química de las mismas. Concomitantemente, el hielo provoca daño y ruptura tisular por expansión mecánica y la hiperosmolaridad del compartimiento líquido modifica las propiedades coligativas del medio,

descendiendo la temperatura de cristalización e incrementando la viscosidad. En la formación de cristales y el daño tisular resultante influyen variables tales como el volumen de la muestra, la viscosidad del sistema y la velocidad de enfriamiento [54]. Los cambios anteriormente descritos han permitido mejorar las técnicas de criopreservación, de tal manera que muchos estudios se han enfocado en buscar métodos viables y soluciones preservantes adecuadas para la conservación de tejidos [52].

La especie ovina es el modelo animal para el estudio de la criopreservación de ovarios enteros, ya que los ovarios de esta especie tienen un estroma fibroso y denso además de una alta densidad de folículos primordiales en la corteza, lo que los hace funcionalmente similar al ovario de la mujer [39].
En un estudio; (Ariel Revel, Amir Elami, Amir Bor, Saar Yavin, Yehudit Natan, Amir Arav, Israel, 2004). Realizaron trasplante de ovarios criopreservados en ocho ovejas Assaf de 12 meses de edad. La intervención se llevó a cabo por laparotomía media bajo anestesia general. La arteria ovárica fue perfundida con solución 1,4 M de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% a 4° C durante 3 minutos y luego se introdujo en un tubo de congelación con el mismo crioprotector. La congelación se realizó en un dispositivo de congelación de Gradiente-Multi-Termal con cuatro ámbitos de temperatura dentro de bloques de cobre de 270-mm [3]. (*MTG; IMT Ltd., Ness Ziona, Israel-Arav EE.UU. Patente 5873254*).

El tejido se sometió a enfriamiento progresivo a través de gradientes de temperatura predeterminados resultando en una tasa de enfriamiento. Los porcentajes de refrigeración se establecieron mediante la variación de la velocidad con la cual el tubo pasó a través de los gradientes de temperatura. La congelación se realizó a una temperatura final de - 30 °C a 0,01 mm/seg, con tasas el enfriamiento de 0,6°C/min hasta la temperatura de siembra de 0,3 °C/min hasta la temperatura final de conservación, después de lo cual, los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido. La descongelación se llevó a cabo sumergiendo el tubo de ensayo en un baño de maría a 68 ° C durante 20 segundos y luego en un baño de

agua a 37 ° C durante 2 minutos. La temperatura se midió con cuidado durante la descongelación para evitar el calentamiento de los ovarios por encima de 20 ° C. Mediante estas técnicas de congelación y descongelación los autores evitaron los daños por criopreservación descritos anteriormente. Luego de la criopreservación, los autores procedieron a realizar el autotrasplante ovárico heterotópico en los animales del estudio. Dos meses después del exitoso autotrasplante, se realizó una laparotomía en las 5 ovejas, y la cirugía reveló adherencias graves en todo el ovario trasplantado en una oveja, adherencias leves en tres ovejas, y no adherencias en una oveja. Seis meses después del trasplante se tomaron semanalmente muestras de sangre para medir los niveles de progesterona, y evaluar la actividad ovárica. Tres de las ocho ovejas trasplantadas mostraron ciclicidad normal, con concentraciones de progesterona de 0,2 a 4,0 ng/m [55].

Los progresos en la criopreservación de tejido ovárico dieron lugar al desarrollo de técnicas de preservación del ovario entero en ovejas mediante la vitrificación y enfriamiento lento. El primer trasplante de un ovario intacto sometido a congelamiento y descongelado se realizó en el año 2003 por Bedaywi y col (2003). a través de anastomosis microvascular [56]. Después de la disección laparoscópica, los ovarios fueron perfundidos con heparina, suero fetal bovino al 10%, solución Leibovitz medio y finalmente, 1,5-M dimetilsulfóxido (DMSO) a través de la arteria ovárica. Los ovarios fueron criopreservados por enfriamiento lento a -140°C en crioviales, los cuales se sumergieron en nitrógeno líquido. Para la descongelación se colocaron en inmersión los crioviales en un baño de agua a 37°C, seguida de perfusión con medio Leibovitz L-15 y 10% suero fetal bovino durante 20 minutos. Seguidamente se realizó el autotrasplante, en el sitio de la arteria epigástrica. En un total de 11 ovarios fueron trasplantados, los autores no encontraron diferencias significativas en los valores medios de apoptosis y viabilidad folicular del ovario en comparación con los segmentos de tejido cortical criopreservado y autotrasplantado; adicionalmente, en este estudio, se midió la concentración plasmática de hormona estimulante del foliculo (FSH) y los valores fueron

significativamente mayores en comparación con los animales injertados con segmento de tejido ovárico [39] .

Además, los autores demostraron que la actividad endocrina de los ovarios enteros congelados-descongelados fue de similar a los valores preoperatorios en los animales del estudio. Los ovarios postransplantados respondieron a la estimulación con FSH y produjeron ovocitos viables, adicionalmente, los ovarios mostraron crecimiento de folículos primordiales, primarios, secundarios, antrales y preovulatorios, con vascularización completamente funcional que se manifestó por la expresión del factor VIII, Factor de Crecimiento Vascular Endotelial y del Agente de Contratación del Músculo Liso [39].

La criopreservación del ovario completo usando el protocolo lento ha sido desarrollado en humanos, mostrando la integridad vascular y folicular del ovario despuesd e la congelacion y el implante. Los avances recientes en la criopreservacipónd e ovarios humanos usando el método de congelación multi-gradiente también ha mostrado resultados promisorios [45].

Durante muchos años los intentos de crio preservación han tenido malos resultados debido al tipo de congelación, por la falta de homogeneidad en la velocidad de enfriamiento entre el núcleo y la periferia del órgano. Por esta razón se han propuesto dos tipos de metodologías. La vitrificación, y el gradiente de congelación de dirección multitermal. La primera ha tenido muchos inconvenientes tales como: toxicidad química tras la exposición a muy alta concentraciones de soluciones crio protectoras, y las fracturas en el momento de la vitrificación y desvitrificación. El segundo método ha resuelto este problema mediante el mantenimiento uniforme de velocidad de enfriamiento a través de todo el órgano. Esto se logra gracias a la utilización de dos termopares uno en la corteza y el otro en la parte central de la médula, generando una velocidad de enfriamiento uniforme en toda la periferia y el núcleo del ovario [3].

En resumen, la congelación de dirección es una tecnología prometedora que permite la congelación de órganos y tejidos grandes, aplicado recientemente con éxito en otros órganos tales como un corazón e hígado en su conjunto y en tejidos como cartílago. Los datos obtenidos de este trabajo son muy alentadores para sugerir la congelación de todo el ovario como método de elección para conservar la función endocrina del ovario [3].

4.10 Vitrificación

La vitrificación es un procedimiento de congelación que atrapa a todos las soluciones acuosas en una fase sólida, descrita como amorfa o vítrea, evitando la formación de cristales de hielo [57].

A diferencia de los protocolos clásicos de enfriamiento lento, la vitrificación evita lesiones celulares causadas por cristales de hielo extracelular. La concentración del crioprotector debe mantenerse lo más bajo posible, por razones de citotoxicidad, pero siendo suficiente para garantizar una velocidad de refrigeración crítica [57].

La vitrificación es un método de criopreservacion preferible debido a que criopreserva mejor los sistemas biológicos complejos y heterogéneos, tales como los ovarios. La técnica evita los peligros de formación de hielo intracelular y extracelular de cristales. El tejido ovárico, sin embargo, es heterogéneo, y cada uno de sus tipos de células tiene su velocidad de enfriamiento óptimo propia, lo que dificulta para seleccionar una velocidad adecuada de enfriamiento para todo el tejido [57].

En cuanto a la vitrificación ovárica, en seres humanos se han obtenido buenos resultados en términos de la morfología del folículo después de la vitrificación de un fragmento de la corteza ovárica. Los datos sobre la corteza del ovario humano, sin embargo, siguen siendo limitados. Se han descrito varios estudios con

resultados exitosos sobre vitrificación de tejido ovárico en especies animales como ratones, ratas y hámsters [57].

El énfasis de este estudio es crio preservación de tejido ovárico cortical en lugar de la crio preservación del ovario entero, ya que el trasplante de tejido cortical es mucho más fácil de realizar que el trasplante micro vascular del ovario completo. El éxito de la técnica descrita depende de la delgadez de la muestra (1mm). Donde se debe de garantizar una penetración rápida de agentes crio protectores con la concentración correcta y la retirada de líquidos de la célula para prevenir la formación de hielo intracelular. De esta forma garantiza una buena supervivencia posterior a la crio preservación. Las dos claves para obtener una supervivencia del tejido ovárico a largo plazo, es obtener una rápida revascularización, de esta forma evitamos la perdida de ovocitos por presencia de micro isquemias. Y la disminución de los daños de congelación. Ambos se logran con injertos lo más fino posibles. Los resultados obtenidos sugieren que el tejido ovárico puede ser conservado de forma segura con la vitrificación de refrigeración ultra-rápido mediante el método Cryotissue y que la función ovárica puede estar completamente restaurada después del trasplante del tejido luego de ser vitrificados y descongelado. Indicando que el autotrasplante de este tejido en las vacas indica que incluso la pérdida de ovocitos por isquémico se puede obviar. Por lo tanto este método tiene un potencial prometedor para el uso clínico en el rescate de la fertilidad de los pacientes con cáncer, y también para ampliar el reproductiva esperanza de vida de pacientes sin cáncer [24]. En 2007 un equipo de investigación, reportó el nacimiento de cuatro ovejas luego de haber realizado injertos ortotópicos de fragmentos de corteza ovárica vitrificados, utilizando la solución de vitrificación *Rall y Fahy* 1 (VS1). Estos resultados fueron comparables a los que se obtuvieron con un protocolo de enfriamiento lento/rápido para realizar autoinjerto de la corteza congelada en ovejas. Este protocolo de vitrificación de corteza ovárica habilita la recuperación de función ovárica y la gestación, pero con un agotamiento rápido del tejido injertado. Los autores recomiendan vitrificar los

ovarios enteros con su pedículo vascular lumbo-aórtico con el fin de reducir la pérdida de folículos en la revascularización del injerto [57].

Los primeros trabajos relacionados con la criopreservación del ovario fueron realizados en murinos [56,57,58,59,60]. La corteza ovárica alberga una población de folículos primordiales que responden bien a la exposición de procedimientos criopreservantes[58]. En un estudio el Dr. Campos y col, se describe como luego de la criopreservación ovárica, es posible conservar la normalidad morfológica de los folículos después de la descongelación usando DMSO [59]. Los folículos criopreservados, y luego descongelados, al ser aislados enzimáticamente muestran al microscopio electrónico integridad estructural y viabilidad, usando técnicas específicas de tinción vital [60]. El éxito funcional del modelo de criopreservación ovárica se ha demostrado por la restitución de la función reproductiva que se ha observado en protocolos experimentales de ratón con implantes ortotópicos. Se ha descrito como la criopreservación y el autoimplante de tejido ovárico humano generan una sustancial reducción en el tamaño de la población folicular recuperada en el descongelamiento[58]. La prueba mayor de la integridad de este tejido es la publicación reciente de dos embarazos luego de reimplantado el tejido ovárico que se había criopreservado [61].

5. Consideraciones éticas

El trabajo se debe basar en lo planteado por el Estatuto Nacional de Protección de Animales, Ley 84 de 1989, en el Capítulo VI, Del uso de animales vivos en experimentos e investigación, Artículos 23 y 24, planteando:

- ART. 23.- Los experimentos que se lleven a cabo con animales vivos, se realizarán únicamente con autorización previa del Ministerio de Salud Pública y sólo cuando tales actos sean imprescindibles para el estudio y avance de la ciencia, siempre y cuando este demostrado [63].

a. Que los resultados experimentales no puedan obtenerse por otros procedimientos o alternativas [63].

b. Que las experiencias son necesarias para el control, prevención, el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades que afecten al hombre o al animal [63].

c. Que los experimentos no puedan ser sustituidos por cultivo de tejidos, modos computarizados, dibujos, películas, fotografías, video u otros procedimientos análogos [63].

- ART. 24.- El animal usado en cualquier experimento deberá ser puesto bajo los efectos de anestesia lo suficientemente fuerte para evitar que sufra dolor [63].

Si sus heridas son de consideración o implican mutilación grave, serán sacrificados inmediatamente al término del experimento [63].

Además de lo anterior se debe de tener presente las tres R's de Russel, que son mencionadas por el código internacional de ética, y que es importante referirlas, y explicar en qué consiste cada una de ellas, ya que estas son el fundamento ético para los trabajos de experimentación con animales vivos [63].

Reducción del número de animales sin disminución de la precisión: esta alternativa pretende que las experimentaciones utilicen el menor número de animales, sin que se vea perjudicada la precisión de los resultados. Existe evidencia de que un diseño inadecuado y un análisis estadístico inapropiado, conducen a malos resultados donde se da un uso ineficiente de animales y recursos científicos. Esta alternativa también plantea la posibilidad de la sustitución de especies por algunas de menor desarrollo, según la escala filogenética [63].

Reemplazo de animales: esta alternativa busca sustituir animales conscientes por animales inconscientes o materiales no sensibles como tejidos. Existen dos tipos de remplazo; el relativo, en el cual se da el sacrificio humanitario de animales vertebrados para obtener células, tejidos u órganos para estudios in vitro, y el absoluto, en el que los animales son remplazados por cultivos de células humanas, de invertebrados, o tejidos [63].

Refinamiento: es la tercera R de Russel, que se refiere al uso de técnicas para reducir el dolor y las molestias, para mantener el bienestar del animal [63].

6. Conclusiones

- Las técnicas de trasplante y criopreservacion de ovarios en bovinos, tienen una importante aplicabilidad como modelo animal para estudiar las posibilidades de implementar las técnicas en la medicina humana; en mujeres con problemas de infertilidad y cáncer.

- El trasplante y la criopreservacion ovárica en los bovinos, son herramientas que permitirían conservar el material genético de animales de alto valor comercial, con mayor eficiencia que otras técnicas como la aspiración folicular o la congelación de oocitos, dado que estas técnicas de trasplante y criopreservacion de ovarios permiten preservar el 100% del material genético, al permitir perpetuar la viabilidad de un ovario con todo su material reproductivo, si se cuenta con un animal receptor.

- La clonación, podría constituir otra forma de inmortalizar el material genético de animales de alto valor comercial, pero tiene la gran desventaja de presentar un alto valor económico de producción y grandes exigencias de tecnología y conocimiento.

- Entre las técnicas de trasplante existentes, el Alotrasplante es la mas viable y segura para ser aplicada en bovinos.

- El trasplante y la criopreservacion de ovarios, juegan un papel importante en la búsqueda de la conservación de material genético de especies en peligro de extinción.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana 2019 (PEGA), Fedegan. Hallado en http://portal.fedegan.org.co/Documentos/pega_2019.pdf, Acceso el 11 de Junio de 2009.

2. Competitividad de la Cadena Agroalimentaria de la Carne Bovina, [Sitio en Internet] Agrocadenas, Hallado en http://www.agrocadenas.gov.co/carnica/ Documentos/AcuerdoCNCB.pdf, Acceso el 11 de Junio de 2009.

3. Arav A et al. Ovarian function 6 years after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovaries. Reproductive Biomedicine. 2010. Vol 20. Pp 48-52.

4. Adams GP, Pierson RA. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. Theriogenology. 1995; Vol 43. Pp 113-120.

5. Bols P.E.J. Xenotransplantation in immunodeficient mice to study ovarian follicular development in domestic animals. Theriogenology. 2010. Vol 73. Pp 740-747.

6. La cadena cárnica bovina en Colombia, [Sitio en Internet] Acovez, Hallado en http://www.acovez.org/index.php?option=com_ content&task= view& id=4&I temid=0 , Acceso el 11 de Junio de 2009.

7. Sztein J, Sweet H, Farley J, Mobraaten L. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. Biol Reprod 1998;58:1071–4).

8. Shaw JM, Nakagata. Cryopreservation of transgenic mouse lines. Methods Mol Biol 2002;180:207–28

9. Hafez E S E, Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª edición. 2002. Cap 2, Pp 13-29.

10. Rivera H.. Revisión anatómica del aparato reproductor de las vacas. Dairy cattle reproduction conference. Mineapolis 2009. Pp 103-110.

11. Dyce K M, Sack W O, Wensing C J G. Aparato Urogenital, Pelvis y órganos reproductores femeninos de los rumiantes. Anatomía Veterinaria, 2ª edición, cap 5 y 29, Pp 213-214, 777-784.

12. Pérez Marín, C.C., I. Rodríguez Artiles, J. Dorado Martín, M.Hidalgo Prieto, S. Corral Peña y J. Sanz Parejo. Dinámica Folicular Ovárica en Vacas Repetidoras: Estudio ecográfico y perfil de Progesterona. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba, España 2002. Pp 10-12.

13. Jaiswal RS, Singh J, Marshall L, Adams GP. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. Theriogenology. 2009. Vol 72. No 1. Pp 81-90.

14. Gimenes LU y col. Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers. Theriogenology. 2008. Vol 69. No 7. Pp 852-8.

15. Pfeifer LF y col. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. Theriogenology. 2009. Vol 72. No 8. Pp 1054-64.

16. Sordillo LM, Contreras GA, Aitken SL. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. Anim Health Res Rev. Vol 10 No 1. 2009. Pp 53-63.

17. Oliveira LJ, Hansen PJ. Phenotypic characterization of macrophages in the endometrium of the pregnant cow. Am J Reprod Immunol. 2009 Dec; Vol 62 No 6. Pp. 418-26.

18. Monique C.J. Parisa, Melanie Snow, Shae-Lee Cox, Jill M. Shaw Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? Theriogenology. 2004. Vol 61. 277–291.

19. Medawar J. Reminiscences of Peter Medawar. Abstract: Transplant Proc 1999. Vol 31. No 1/2. Pp 49.

20. Hamilton D. Kidney transplantation: a history. In: Morris PJ, editor. Kidney transplantation: principles and practice. London: Grune & Stratton; 1984. p. 1–13.

21. Reemtsma K, Mc Crackern BH, Schlegel JU, Pearl MA, Pearl CW, DeWitt CW, et al. Renal heterotransplantation in man. Ann Surg 1964;160:384–410.

22. D. Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet Res 1966;8(3): 295–309.

23. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. Hum Reprod 1996. Vol 11. Pp 1487–91.

24. Noriko Kagawa, Sherman Silber, Masashige Kuwayama. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. Vol 18. No 4. 2009 568-577 Reproductive

BioMedicine Online; www.rbmonline.com/Article/3461 on web 24 February 2009.

25. Hanckle K . Ovarian transplantation for fertility preservation in a sheep model: can follicle loss be prevented by antiapoptotic sphingosine-1-phosphate administration? Informa UK Ltd. 2009.

26. Eraslau S, Hamernik RJ, Hardy JD: Replantation of uterus and ovaries in dogs with successful pregnancy. Arch Surg 92:9, 1966.

27. Denjean R, Boeck W, Gordts S, et al: Ovarian transplantation by selective microvascular anastomosis in the rabbit. Br J Obstet Gynaecol. Vol 89 No 652. Pp 19825-19827).

28. Baird D. T., Webb R., Campbell B. K., et al. Long-Term Ovarian Function in Sheep after Ovariectomy and Transplantation of Autografts Stored at – 196* C. Endocrinology. 1999. Vol 140 No 1. Pp 462-471.

29. Gunasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Bush M, Raath C, Critser ES, et al. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (Loxodonta africana) ovarian tissue. Anim Reprod Sci. 1998;53:265–75.

30. American Society for Reproductive Medicine. Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation. Fertility and Sterility. 2004. Vol 82. No 6. Pp 1714-1715.

31. Abrahamsen EJ. Ruminant field anesthesia. Vet Clin Food Anim. 2008. Vol 24. Pp 429–441.

32.. Abrahamsen EJ. Chemical Restraint in Ruminants. Vet Clin Food Anim 2008. Vol 24. Pp 227–243.

33. British Transplantation Society. Management of immunosupression. Towards standards for organ and tissue transplantation in the United Kingdom. 1998. Pp. 38.

34. Shapiro R. Immunosuppressive regimens for sparing and avoiding corticosteriods and calcineurin inhibitors in renal transplantation. A J Transpl 2002. (Conference).

35. Platt JL, Holzknecht ZE. Porcine platelet antigens recognized by human xenoreactive antibodies. Transplantation 1994. Vol 57. Pp 327–35 .

36. Leventhal JR, Matas AJ, Sun LH, Reif S, Bolman RM, Dalmasso AP, et al. The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model. Transplantation 1993. Vol 56. Pp 1–825.

37. McCurry KR, Parker W, Cotterell AH, Weidner BC, Lin SS, Daniels LJ, et al. Humoral responses in pigto- baboon cardiac transplantation: implications for the pathogenesis and treatment of acute vascular rejection and for accommodation. Hum Immunol 1997. Vol 58. Pp 91–105.

38. NOVA. Publicación científica. ISSN:1794-2470. Vol.4 No. 6 Junio - Diciembre de 2006. Pp 1-114.

39. Jason G. Bromer, M.D.,1 and Pasquale Patrizio, M.D., M.B.E., HCLD1 Fertility Preservation: The Rationale for Cryopreservation of the Whole Ovary. Semin Reprod Med 2009. Vol 27. Pp 465–471.

40. P. Mhatre, J. Mhatre, and R. Magotra. Ovarian transplant: a new frontier. Transplantation Proceedings, 2005. Vol 37. Pp 1396–1398.

41. Parisa M. C.J. Snowb M, Cox S.L. Shawc J.M. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? Theriogenology. 2004Vol 61. Pp 277–291.

42. Rodriguez JR. and Dobrinski I. Recent developments in 1 testis tissue xenografting. Theriogenology. 2004. Vol 61. Pp 277-291.

43. Meraz M.M., Restoration of Endocrine Function and Fertility with Orthotopic Tubal—Ovarian Allotransplant as the Anatomical-Functional Unit in Rabbits, Journal of Investigative Surgery, 21:348–359, 2008.

44. Meraz M.M., Gracida C.J., Melchor J.L.O., Revilla C.M., De Buen N., and Aburto E.M. Restoration of Endocrine Function and Ovulation After a Heterotopic Ovarian Transplant in the Inguinal Region of Rabbits Using a Vascular Microsurgical Technique. Elsevier. 2006 Vol 38. Pp 952–957.

45. Demeestere I. Simon P. Emiliani S. Delbaere A. and Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. Hum Reprod Update. 2009. Vol 15. No 6. Pp 649–665.

46. Gook DA, McCully BA, Edgar DH, McBain JC. Development of antral follicles in human cryopreservedovarian tissue following xenografting. Hum Reprod 2001. Vol 16. Pp 417–22.

47. Zohar G, Elami A and Arav A. Heterotopic Transplantation of cryopreserve whole bovine ovaries. Cryobiology. 55. 2007. Pp 324-378.

48. Vivanco W. Mejoramiento genético bovino a través de tecnologías reproductivas de avanzada. III Seminario Internacional. Competitividad en Leche y Carne 2002; 227-247.

49. Rodríguez L.A, Aspiración folicular guiada por ultrasonido, [Sitio en Internet] asociación Angus y Brangus de Colombia. Hallado en: http://www.asoangusbrangus.org.co/tecnico7.htm Acceso el 8 septiembre 2007.

50. Blondin, P.; Bousquet, D.; Twagiramungu, H.; Barnes, F. and Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biology of Reproduction. Vol. 66. 2002; Pp. 38-43.

51. Héctor Nava-Trujillo, MV, Hugo Hernández-Fonseca, MV, PhD. Aspiración folicular transvaginal. Manual de Ganadería Doble Propósito. 2005. Cap 3. Pp 611-614.

52. Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Souza CJ, Baird DT. Glucose uptake and lactate production by the autotransplanted ovary of the ewe during the luteal and follicular phases of the oestrous cycle. Theriogenology. 2010 73(8):1061-7.

53. Bernard A, Fuller BJ. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. Hum Reprod Update 1996;2:193-207.

54. Platt JL, Holzknecht ZE. Porcine platelet antigens recognized by human xenoreactive antibodies. Transplantation 1994;57:327–35.

55. Revel. A., Elami. A., Bor. A., Yavin. S., Natan. Y., Arav. A. Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation. Fertility and sterility. 2004. Vol. 82, No. 6, Pp 1714-1715.

56. Bedaiwy MA, Jeremias E, Gurunluoglu R, et al. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozenthawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. FertilSteril 2003;79(3):594–602.

57. Lornage J.y Salle B., Ovarian and oocyte cryopreservation, Curr Opin Obstet Gynecol, 2007; 19(4), Pp 390-394.

58. Parkes A, Smith A. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1953. Vol 140. Pp 455-67.

59. Parkes A. Grafting of mouse ovarian tissue after freezing and thawing. J Endocrinol 1956. Vol 14. No 3. Pp 30-1.

60. Parkes A. Viability of ovarian tissue after freezing. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1957. Vol 147. Pp 520-8.

61. Deanesly R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. J Endocrinol 1954. Vol 11. Pp 197-200.

62. Deanesly R, Parkes A. Delayed development of grafts from frozen ovarian tissue. J Endocrinol 1956. Vol 14. Pp 35-6

63. De Osorio Afife Mrad. Principios Éticos Internacionales para Investigación Biomédica con Animales del CIOMS. Revista Colombiana de Bioética. Vol 1. No1. 2006.