

## **Estat actual de les tècniques de criopreservació en la optimització de la fertilitat femenina**

---

Estudiant: JÚLIA FELIU MARGALEF

Grau en Biologia

Correu electrònic: jfeliumargalef@gmail.com

Tutor: M. DOLORS BRIZ GONZALEZ

Cotutor\*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: M. DOLORES BRIZ GONZALEZ

Nom del cotutor\*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): mailo.briz@udg.edu

\*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 28/05/2015

# ÍNDEX

RESUM

RESUMEN

ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. CRIOPRESERVACIÓ D'OÒCITS I D'EMBRIONS</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. MÈTODES DE CRIOPRESERVACIÓ D'OÒCITS I D'EMBRIONS</b> .....	<b>5</b>
1.2.1. CONGELACIÓ LENTA O CONVENCIONAL D'OÒCITS I D'EMBRIONS.....	5
1.2.2. VITRIFICACIÓ D'OÒCITS I D'EMBRIONS .....	6
<b>2. OBJECTIVES</b> .....	<b>8</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>8</b>
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b> .....	<b>9</b>
<b>4.1. CRIOPRESERVACIÓ D'EMBRIONS HUMANS</b> .....	<b>9</b>
4.1.1. CONGELACIÓ LENTA O CONVENCIONAL.....	11
4.1.2. VITRIFICACIÓ .....	11
4.1.3. EFECTES DE LA CRIOPRESERVACIÓ SOBRE ELS EMBRIONS HUMANS.....	12
<b>4.2. CRIOPRESERVACIÓ D'OÒCITS HUMANS</b> .....	<b>12</b>
4.2.1. CONGELACIÓ LENTA O CONVENCIONAL.....	14
4.2.2. VITRIFICACIÓ .....	14
4.2.3. EFECTES DE LA CRIOPRESERVACIÓ SOBRE ELS OÒCITS HUMANS.....	14
<b>4.3. SEGURETAT I ALTRES ASPECTES DE LA CRIOPRESERVACIÓ</b> .....	<b>18</b>
<b>4.4. COMPARACIÓ ENTRE LA CRIOPRESERVACIÓ D'OÒCITS I D'EMBRIONS</b> .....	<b>19</b>
<b>4.5. COMPARACIÓ ENTRE LA CONGELACIÓ LENTA I LA VITRIFICACIÓ</b> .....	<b>20</b>
4.5.1. OÒCITS EN MII.....	20
4.5.2. OÒCITS EN ESTADI PRONUCLEAR (ZIGOT) .....	21
4.5.3. EMBRIONS EN ESTADIS DE SEGEMENTACIÓ PRIMERENCs.....	21
4.5.4. EMBRIONS EN ESTADI DE BLASTOCIST.....	23
<b>5. CONCLUSIONS</b> .....	<b>24</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>25</b>

## **AGRAÏMENTS**

M'agradaria donar les gràcies principalment a la meva tutora, Mailo Briz, per donar-me l'oportunitat de poder realitzar el treball en el departament de reproducció i pel suport i l'esforç que suposa tutoritzar un treball final de grau. També m'agradaria agrair en conjunt a tots els integrants del departament per les petites contribucions i pels bons moments que m'han fet passar. Gràcies.

## RESUM

La criopreservació consisteix en congelar cèl·lules o teixits a molt baixes temperatures per tal d'evitar la mort cel·lular mitjançant la utilització de nitrogen líquid. S'utilitzen substàncies crioprotectores que protegeixen les cèl·lules enfront del xoc tèrmic, com per exemple l'etilenglicol i el dimetil sulfòxid, entre d'altres. Tanmateix, com a conseqüència del refredament es produeixen efectes deleteris en les cèl·lules que poden comprometre la seva supervivència i viabilitat. La criopreservació és un procés molt útil per a les tècniques de reproducció assistida, ja que, permet conservar els dos tipus de cèl·lules reproductores, oòcits i espermatozoides, i també embrions. La criopreservació d'oòcits i d'embrions esdevé important quan es vol preservar la fertilitat femenina, per exemple, en casos de persones amb càncer o amb malalties autoimmunitàries i, també de dones que per qualsevol altre motiu tenen la seva funció reproductora afectada. Actualment, existeixen dos mètodes de criopreservació d'oòcits i d'embrions utilitzats als laboratoris d'embriologia clínica: la congelació lenta o convencional i la vitrificació. En el primer cas, les cèl·lules són exposades a una concentració moderada de crioprotectors, tant penetrants com no penetrants, i es produeix un descens gradual de la temperatura fins arribar a la temperatura d'ebullició del nitrogen líquid (-196°C). En la vitrificació, s'exposen les cèl·lules a altes concentracions de crioprotectors i mitjançant el contacte directe amb el nitrogen líquid s'assoleix una congelació ultraràpida. La criopreservació embrionària és utilitzada àmpliament avui dia, mentre que, l'oocitària encara es considera experimental. Això és degut a que l'embrió té una major permeabilitat als crioprotectors i és més resistent al dany causat per la criopreservació en comparació amb l'oòcit. Malgrat tot, la criopreservació d'oòcits suposa un avantatge en quant a la manipulació mèdica i a la despesa econòmica que implica el procés. A més a més, aquesta última no implica tants dilemes morals, ètics i religiosos com la criopreservació embrionària. Avui dia, dels dos mètodes possibles de criopreservació, el que s'utilitza de forma més habitual és, principalment, la vitrificació, la qual permet obtenir millors taxes d'èxit que la congelació lenta. Tot i els avenços assolits en el camp de les tècniques de reproducció assistida, la criopreservació encara és un tema objecte d'una àmplia recerca; ja que, es volen millorar els protocols per tal d'obtenir els millors resultats possibles amb la màxima seguretat.

## RESUMEN

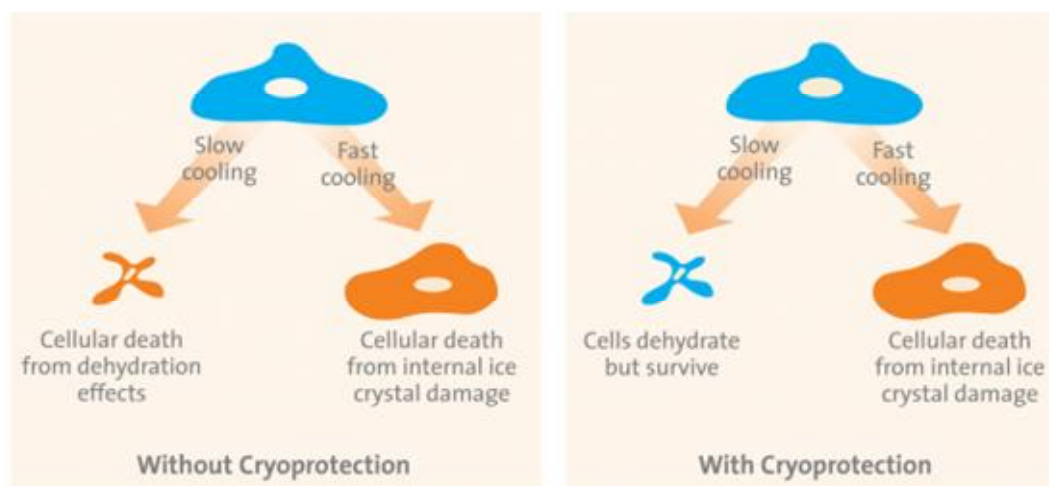
La criopreservación es un proceso que consiste en congelar células o tejidos a muy bajas temperaturas con la finalidad de evitar la muerte celular mediante el uso de nitrógeno líquido. Se utilizan sustancias crioprotectoras que protegen las células frente al choque térmico, como por ejemplo el etilenglicol y el dimetil sulfóxido, entre otros. No obstante, debido a la congelación se producen efectos deletéreos en las células que pueden comprometer su supervivencia y viabilidad. La criopreservación es un proceso muy útil para las técnicas de reproducción asistida, ya que, permite conservar los dos tipos de células reproductoras, oocitos y espermatozoides, y también embriones. La criopreservación de oocitos y embriones es importante cuando se quiere preservar la fertilidad femenina, por ejemplo, en casos de personas con cáncer o con enfermedades autoinmunes y, también de mujeres que por cualquier otro motivo tienen su función reproductora afectada. Actualmente, existen dos métodos de criopreservación de oocitos y de embriones utilizados en los laboratorios de embriología clínica: la congelación lenta o convencional y la vitrificación. En el primer caso, las células son expuestas a una concentración moderada de crioprotectores, tanto penetrantes como no penetrantes, y se produce un descenso gradual de la temperatura hasta llegar a la temperatura de ebullición del nitrógeno líquido (-196°C). En la vitrificación, las células se exponen a altas concentraciones de crioprotectores y mediante el contacto directo con el nitrógeno líquido se consigue una congelación ultrarrápida. La criopreservación embrionaria es utilizada ampliamente hoy en día, mientras que, la oocitaria aún es considerada experimental. Esto es debido al hecho que el embrión tiene una mayor permeabilidad a los crioprotectores y es más resistente al daño causado por la criopreservación comparado con el oocito. No obstante, la criopreservación de oocitos supone una ventaja en lo que concierne a la manipulación médica y el coste económico que implica el proceso. Además, esta última no implica tantos dilemas morales, éticos y religiosos como la criopreservación embrionaria. Hoy día, de los dos métodos posibles de criopreservación, el que se utiliza de forma más habitual es, principalmente, la vitrificación, la cual permite obtener mejores tasas de éxito que la congelación lenta. A pesar de los avances logrados en el campo de las técnicas de reproducción asistida, la criopreservación aún es un tema objeto de una amplia investigación; ya que, se pretende mejorar los protocolos con la finalidad de obtener los mejores resultados posibles con la máxima seguridad.

## ABSTRACT

Cryopreservation consists of freezing cells or tissues at very low temperatures using liquid nitrogen in order to avoid cellular death. Substances called cryoprotectants are used to protect the cell against thermal shock, ethylene glycol and dimethyl sulfoxide are used among others. However, as a result of cooling, deleterious effects occur on cells that could compromise their survival and viability. Cryopreservation is a useful process for assisted reproductive technologies because this method allows preserving the two types of sex cells, oocytes and spermatozoa, as well as embryos. Embryo and oocyte cryopreservation becomes important when female fertility must be preserved, for instance in cases of cancer or autoimmune diseases and, for women with reproductive dysfunction due to other reasons. Currently, there are two methods used for embryo and oocyte cryopreservation in the laboratories of clinical embryology: slow freezing and vitrification. In the first one, cells are exposed to moderate concentrations of cryoprotectants, both permeating and non-permeating and, a gradual decrease on temperature is produced up to liquid nitrogen boiling temperature (-196°C). In the vitrification procedure, cells are exposed to high concentrations of cryoprotectants and, by a direct contact with liquid nitrogen, ultrafast freezing is achieved. Embryo cryopreservation is widely used nowadays, while oocyte cryopreservation is still considered an experimental technique. This is because the advantages of embryo features in comparison to oocyte; for example, embryos have a better permeability to cryoprotectants and they are more resistant to cell damage after cryopreservation. Nevertheless, oocyte cryopreservation has some advantages in terms of medical handling and financial costs. In addition, the last one does not imply so many moral, ethical and religious controversies compared to embryo cryopreservation. The most commonly used cryopreservation method is mainly vitrification, which provides better success rates than slow freezing. Despite progress made in assisted reproductive technologies over last years, cryopreservation is still a subject of extensive research; because there is the purpose to improve the protocols in order to achieve the best possible results with the maximum security.

## 1. INTRODUCCIÓ

La criopreservació és el procés a través del qual cèl·lules o teixits són congelats a molt baixes temperatures (entre  $-80^{\circ}\text{C}$  i  $-196^{\circ}\text{C}$ ) per tal de conservar-los mantenint la seva funcionalitat, ja que, a aquestes temperatures qualsevol activitat biològica, inclús les reaccions bioquímiques que produeixen la mort cel·lular, queden aturades de forma efectiva (Solé *et al.*, 2008). Normalment s'utilitza nitrogen líquid per congelar la mostra perquè aquest permet arribar a temperatures de fins a  $-196^{\circ}\text{C}$ , el punt d'ebullició d'aquest compost. També s'utilitzen crioprotectors que, són compostos químics que protegeixen les cèl·lules enfront del xoc tèrmic, ja que, fonamentalment, incrementen la concentració total de soluts del sistema per tal de reduir la quantitat de gel format i així preveure la deshidratació i la formació de cristalls de gel intracel·lulars. D'aquesta manera s'evita la mort de la cèl·lula i la destrucció dels orgànuls durant el procés previ de congelació i la descongelació posterior. La membrana cel·lular és permeable a alguns crioprotectors (penetrants), en canvi, és impermeable a altres (no penetrants). Els crioprotectors penetrants són agents intracel·lulars que entren dins la cèl·lula per tal d'evitar la formació de cristalls de gel que podrien acabar trencant la membrana i, per tant, lisant la cèl·lula. Molts compostos tenen aquestes propietats com, per exemple, el glicerol, el dimetil sulfòxid (DMSO) i l'etilen glicol (EG), entre d'altres. En canvi, els crioprotectors no penetrants són agents extracel·lulars que no traspassen la membrana cel·lular, però, ajuden a millorar l'equilibri osmòtic que es produeix durant la criopreservació des de l'exterior, estabilitzant proteïnes i lípids de la superfície de la membrana per prevenir l'entrada de cristalls de gel. Alguns exemples de crioprotectors no penetrants són la sacarosa, la dextrosa o la solució crioprotectora que proporciona el rovell d'ou.



**Figura 1.** Efectes cel·lulars de les taxes de congelació. (Recuperat de <http://www.labautopedia.org/>)

La criopreservació és un procés molt útil pel que fa a les tècniques de reproducció assistida (TRA), ja que, permet conservar gàmetes (espermatozoides i oòcits), embrions i també teixit ovàric i testicular en casos específics. La criopreservació espermàtica en humans, introduïda l'any 1960 (Solé *et al.*, 2008), esdevé important quan, per exemple, es vol preservar la fertilitat masculina en casos d'individus sotmesos a tractaments mèdics o quirúrgics, com ara la

radioteràpia o la quimioteràpia, en pacients que presenten càncer. Tot i que és molt important per a les TRA, aquest procediment pot causar dany cel·lular i disminuir la funció dels espermatozoides, com per exemple la motilitat o la viabilitat (Paoli *et al.*, 2013).

L'embrió és l'estadi del desenvolupament prenatal des de la primera divisió del zigot fins la vuitena setmana després de la fecundació en humans; a partir d'aquí s'utilitza ja el terme fetus (en sentit estricte, durant les dues primeres setmanes posteriors a la fecundació, es parla de pre-embrió). La criopreservació d'embrions és una tècnica crucial en casos on es cancel·la la transferència embrionària degut al risc causat per la hiperestimulació ovàrica, quan hi ha pèrdues de sang a l'endometri (sagnat endometrial), quan els nivells de progesterona en el sèrum són molt elevats el dia de l'estimulació (*triggering*), o bé, en qualsevol altre esdeveniment que no estigui previst. També està indicat en casos on les pacients presenten càncer, malalties autoimmunes o transplantaments de medul·la òssia o cèl·lules mare; a més a més, ha permès disminuir el nombre d'embrions transferits i maximitzar l'efectivitat del cicle de fecundació in vitro (FIV) (Konc *et al.*, 2014).

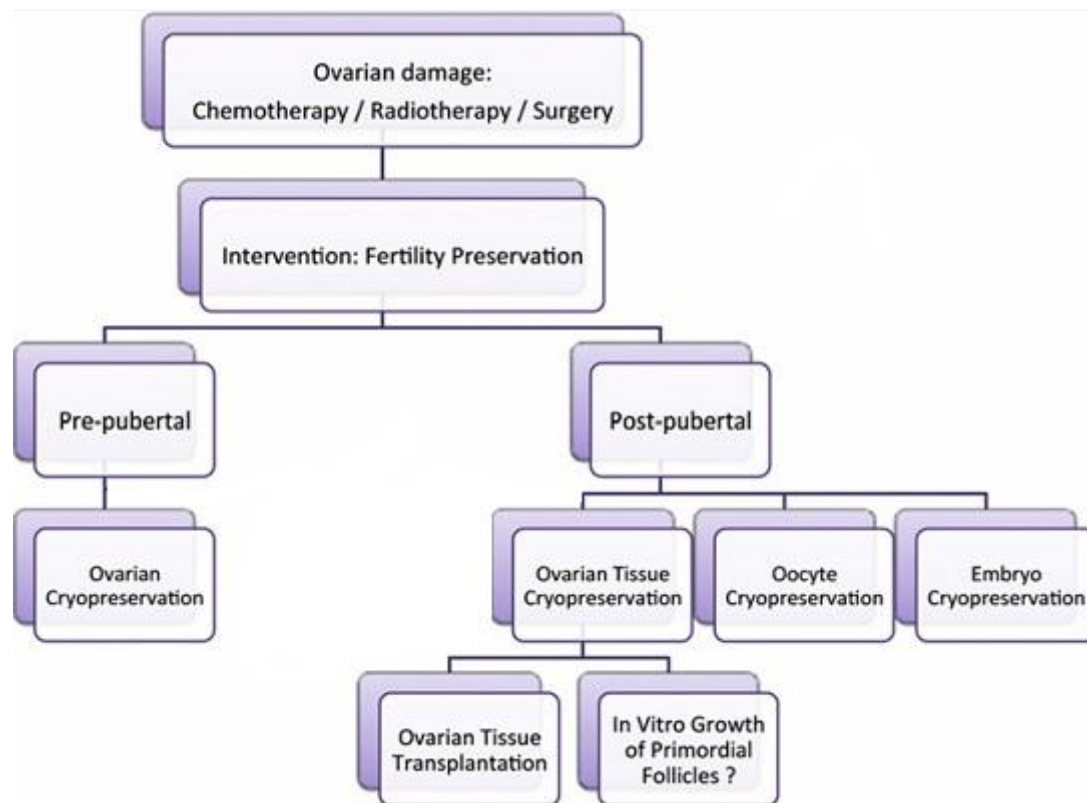
L'òocit (o ovòcit) és la cèl·lula germinal femenina després d'iniciar la meiosi. Els oòcits es produeixen a l'ovari durant el procés d'oogènesi; el nombre d'oòcits que es formen fins el moment del naixement és el total d'oòcits que tindrà la dona durant tota la seva vida, ja que, a diferència dels homes, no generen nous gàmetes durant els seus anys reproductius (Tilly *et al.*, 2009; Nikkura *et al.*, 2009). En el moment del naixement, els oòcits bloquejats en un estadi inicial de maduració es troben en estat latent. Una vegada la dona arriba a la pubertat, a cada cicle estrogènic, es selecciona un grup d'oòcits per tal que continuïn madurant, però, només un d'ells aconseguirà completar el procés i ser alliberat fora de l'ovari, mentre que, la resta degenera dins l'ovari. En el procés de maduració, els oòcits han d'arribar a la segona metafase (MII) de la meiosi i, d'aquesta manera, poden ser fecundats (Luvoni i Pellizari, 2000). Durant la maduració i el creixement fol·licular, els oòcits acumulen grans quantitats de mRNA i proteïnes, necessàries per continuar amb la meiosi, la fecundació i el desenvolupament embrionari (Krisher *et al.*, 2004). La criopreservació d'oòcits ha estat introduïda recentment en les pràctiques clíniques, però, cada vegada pren més importància ja que ofereix més avantatges en comparació amb l'embrionària (Konc *et al.*, 2014). Aquesta tècnica és un complement útil en els diferents tractaments per la infertilitat (Fabbri, 2005).

Pel que fa a la preservació de teixits, tant espermàtic com ovàric, les indicacions són principalment per pacients oncològics, pacients sotmesos a transplantaments de medul·la òssia o de cèl·lules mare i pacients amb malalties autoimmunitàries. La criopreservació de teixit ovàric també s'utilitza en casos d'extirpació de l'ovari practicats en pacients amb tumors ovàrics benignes, endometriosis o profilaxi (*The practice Comittee of the American Society for Reproductive Medicine*, 2008). La criopreservació de teixit ovàric es practica sobretot en pacients oncològiques que no poden sotmetre's a estimulació hormonal perquè existeix un gran nombre de tumors dependents d'hormones, o bé, perquè no es disposa del temps suficient per dur-la a terme degut a la necessitat d'instaurar el tractament contra el càncer urgentment (Solé *et al.*, 2008).

Aquest treball es centra principalment en la criopreservació d'oòcits i d'embrions. Per tant, d'ara en endavant tot el contingut del treball farà referència, fonamentalment, a aquests dos



tipus de criopreservació. En la següent figura es mostren les diferents opcions per preservar la fertilitat femenina (Figura 2).



**Figura 2.** Diferents opcions per preservar la fertilitat femenina. (Modificat de Bedoschi *et al.*, 2013)

### 1.1. CRIOPRESERVACIÓ D'OÒCITS I D'EMBRIONS

L'objectiu de la criobiologia és evitar la mort cel·lular i aconseguir la immortalitat a baixes temperatures. Per arribar-hi, cal eliminar les dues causes principals de mort cel·lular associades amb la criopreservació que són la formació de gel i les concentracions letals de soluts, mentre es manté la capacitat funcional dels orgànuls intracel·lulars (Edgar *et al.*, 2012).

Independentment de la metodologia utilitzada per a la criopreservació, com a conseqüència del refredament es produeixen efectes deleteris en els gàmetes i els embrions que poden comprometre la seva supervivència i viabilitat, perquè durant aquest procés les cèl·lules s'exposen a un gran estrès fisicoquímic (Fuller *et al.*, 2004). Els tres passos clau dels diferents mètodes són els següents:

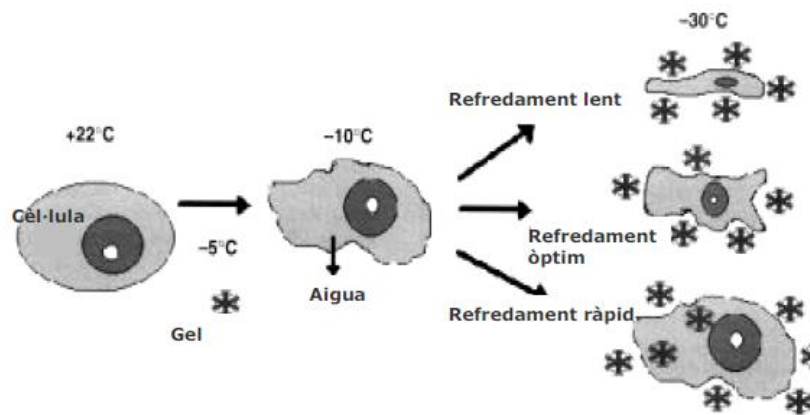
- incorporació de crioprotectors prèviament al refredament
- descens gradual de temperatura fins a la immersió en nitrogen líquid (-196°C)
- escalfament de la mostra fins a la temperatura fisiològica (36,8-37°C).

La supervivència de les cèl·lules en congelació va lligada a molts paràmetres que no sempre es poden controlar. La congelació en equilibri amb el gel (*criopreservació lenta o convencional*) es caracteritza per la coexistència de dues fases o fraccions en la solució: una fracció no congelada i una fracció amb cristalls de gel. Les cèl·lules són excloses dels cristalls de gel i migren cap a la fracció no congelada de la solució on són exposades a nombrosos factors d'estrès com la reducció de la temperatura, l'increment de la concentració iònica i de soluts, la deshidratació, la formació de bombolles de gas, la viscositat, els canvis de pH, etc. Aquests fenòmens determinen una resposta cel·lular basada en canvis de fase dels lípids de membrana, despolimerització del citoesquelet, trencament osmòtic, solubilització de les proteïnes de membrana, processos incontrolats de difusió, alteracions mecàniques a les membranes i al citoesquelet, desnaturalització de proteïnes, etc. (Casas, 2010). La resposta osmòtica de les cèl·lules es considera el primer determinant de la resistència cel·lular davant la formació de gel a la solució (Morris, 2007). La pressió osmòtica ve donada per la temperatura i el nombre de partícules de la solució, d'acord amb la fórmula:

$$P = R \times T \times \sum C,$$

on P és la pressió osmòtica; R és la constant dels gasos (8.314472 J/Kmol); T és la temperatura i C, la concentració. A mesura que el medi extracel·lular es congela després de la nucleació, es torna més concentrat i l'aigua tendeix a sortir de la cèl·lula degut al increment de la pressió osmòtica, de manera que la cèl·lula es va deshidratant progressivament (Mazur, 1963; Dayong *et al.*, 2000). La quantitat d'aigua que es perd depèn de dos tipus de factors que afecten la permeabilitat de l'aigua a través de la membrana cel·lular: intrínsecs (i.e. osmolaritat de la solució intracel·lular, quocient superfície/volum cel·lulars, coeficient de permeabilitat de la membrana a l'aigua -Lp-, contingut aquós del citoplasma) i extrínsecs (i.e. osmolaritat de la solució extracel·lular i taxa de refredament). Els factors intrínsecs vénen donats per la tipologia cel·lular i els extrínsecs es poden controlar i adaptar a la resposta osmòtica de les cèl·lules.

Per una banda, l'osmolaritat de la solució extracel·lular es pot modificar a través de l'addició de crioprotectors penetrants (Mazur, 1963). Per altra banda, la taxa de refredament es pot emmotllar a les característiques de les cèl·lules, tenint en compte la "Hipòtesi dels dos Factors dels danys per congelació" postulada el 1972 (Mazur *et al.*, 1972). Aquesta hipòtesi exposa que sota taxes de refredament massa elevades, com succeeix en el súperrefredament, l'aigua de la cèl·lula no té temps per sortir i es forma gel intracel·lular que malmet els orgànuls, particularment en cèl·lules amb una taxa reduïda de superfície per volum (baixa permeabilitat). Sota taxes de refredament massa lentes, l'aigua surt de la cèl·lula i s'impedeix la formació de gel al seu interior, però, a la vegada, la cèl·lula és deshidrata fins al volum mínim i, exposada durant massa temps als canvis de pH i a la toxicitat del crioprotector ("efectes de la solució") es dona un trencament de la membrana i l'alteració de les funcions cel·lulars. Per tant, la taxa de refredament òptima és aquella que s'adapta a la resposta osmòtica de la cèl·lula per tal de minimitzar la deshidratació i impedir la formació de gel intracel·lular (Figura 3).



**Figura 3.** Fenòmens que poden donar-se a les cèl·lules durant el procés de congelació.  
(Modificat de Dayong *et al.*, 2000).

Una taxa de refredament òptima ha d'encaixar amb les complexes propietats osmòtiques de la cèl·lula viva que és congelada, motiu pel qual no consisteix simplement en una disminució lineal de la temperatura, sinó en diferents taxes de refredament, formant una corba que segueix els canvis físics no lineals en la concentració extracel·lular de soluts i en la permeabilitat de la membrana al llarg de la congelació (Morris *et al.*, 1999; Leibo *et al.*, 1971).

També és important el fet d'aconseguir una taxa de descongelació òptima, ja que, durant la descongelació, les cèl·lules es rehidraten com a conseqüència del sobtat davallament de la concentració extracel·lular per fusió del gel. La supervivència d'una cèl·lula durant el procés de descongelació depèn, bàsicament, de la tolerància a la toxicitat del crioprotector i de la resposta mecànica de la seva membrana quan retorna a les condicions fisiològiques (Rodríguez, 2005). La toxicitat no és un problema comú perquè el crioprotector queda diluït en el medi de descongelació i, durant aquesta etapa, s'apliquen taxes ràpides d'escalfament per prevenir la recristal·lització (conversió de petits cristalls de gel en cristalls més grans que malmetrien la cèl·lula), però, fins i tot així, no es garanteix la recuperació cel·lular si durant la criopreservació s'han produït danys irreversibles (Casas, 2010).

## 1.2. MÈTODES DE CRIOPRESERVACIÓ D'OÒCITS I D'EMBRIONS

Existeixen dos mètodes de criopreservació d'oòcits i d'embrions utilitzats més o menys àmpliament en els centres de reproducció assistida: la congelació lenta o convencional i la vitrificació.

### 1.2.1. CONGELACIÓ LENTA O CONVENCIONAL D'OÒCITS I D'EMBRIONS

Abans del refredament, tant en el cas d'oòcits com d'embrions, s'aconsegueix una deshidratació sense danys excessius mitjançant l'exposició a una concentració de crioprotectors penetrants ( $\leq 1.5M$ ) i també de crioprotectors no penetrants ( $\leq 3M$ ). Durant el refredament lent, el procés de deshidratació continua fins als  $-30^{\circ}C$ . Quan s'aplica una taxa de refredament òptima, normalment, s'arriba a una deshidratació suficient mentre es limita l'exposició als crioprotectors a condicions extracel·lulars hiperosmòtiques. Les taxes de refredament que s'utilitzen actualment van ser establertes per Whittingham *et al.* l'any 1972

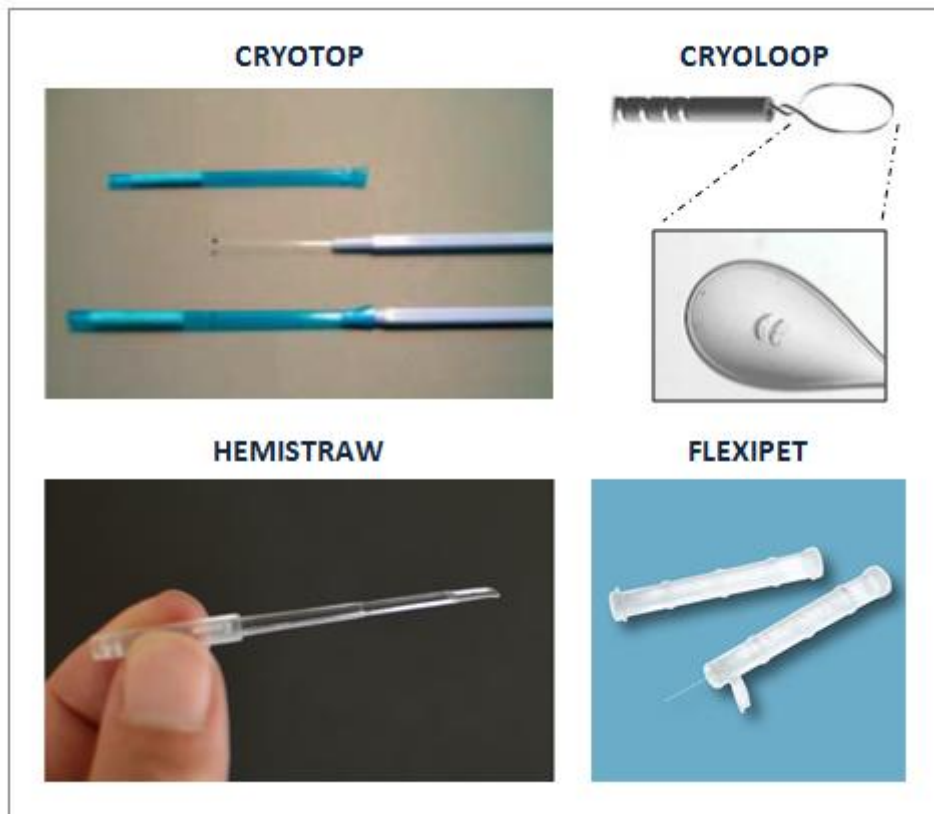
(Whittingham *et al.*, 1972) i, romanen pràcticament inalterades en les pràctiques clíniques vigents avui dia.

En la tècnica del diagnòstic genètic preimplantacional (DGP), per facilitar la biòpsia dels blastòmers es trenca la zona pel·lúcida i, s'ha observat que en aquests embrions hi ha una reducció de la criosupervivència. Per tant, la zona pel·lúcida juga un paper important en el procés de deshidratació, ja que, ofereix protecció contra el medi extern i contra la formació de cristalls de gel dins els oòcits i embrions (Jericho *et al.*, 2003). La deshidratació depèn fonamentalment de la permeabilitat que presenta la membrana cel·lular a l'aigua (permeabilitat hidràulica) i, aquesta pot variar segons l'estadi de desenvolupament en que es trobi la cèl·lula. A efectes pràctics, la congelació lenta inclou l'equilibri dels oòcits o embrions amb una o més solucions deshidratants durant un període d'uns 10 minuts abans de la càrrega d'un volum aproximat de 200 µL a palletes "especials per a la congelació" que quedaran segellades pels dos extrems. Tot seguit, les palletes són col·locades dins una cambra d'una màquina de congelació programable (biocongelador) que redueix la temperatura lentament, aproximadament uns 0.3°C/min fins arribar a -30°C. Durant aquest procés, s'indueix l'inici de la formació dels cristalls de gel (*seeding*) a una temperatura entre -5 i -8°C. Quan s'arriba als -30°C la temperatura es redueix ràpidament fins a -150°C (aproximadament -50°C/min) i, finalment, s'emmagatzemen les palletes que contenen les cèl·lules en tancs de nitrogen líquid (-196°C) (Edgar *et al.*, 2012).

### 1.2.2. VITRIFICACIÓ D'OÒCITS I D'EMBRIONS

El principi de la deshidratació també s'aplica a aquest procés, però, hi ha conceptes que prenen menys importància, com per exemple la permeabilitat hidràulica. Per tal d'aconseguir un estat similar al vidre dins la cèl·lula, és a dir, la vitrificació, s'ha de produir una reducció del contingut d'aigua i un augment de la viscositat del citoplasma. Això s'aconsegueix mitjançant l'exposició a altes concentracions de crioprotectors (>4M), la qual cosa dóna lloc a una contracció extrema de les cèl·lules (*shrinkage*). No obstant, per tal de minimitzar l'impacte de les condicions hiperosmòtiques, el temps d'exposició és reduït a menys d'un minut. Donat que una elevada concentració de crioprotector penetrant pot ser letal o pot causar alteracions en el desenvolupament de la cèl·lula, s'han utilitzat múltiples combinacions de crioprotectors per tal de reduir la toxicitat individual de cada crioprotector mentre s'aconsegueix una solució amb elevada viscositat. També es pot arribar a vitrificar exitosament utilitzant concentracions reduïdes de crioprotectors (<3M), sempre i quan s'aconsegueixi una suficient reducció de la temperatura de forma ràpida posant en contacte directe els oòcits o embrions amb el nitrogen líquid (Vatja *et al.*, 2006).

A la pràctica, la vitrificació s'aconsegueix rutinàriament exposant primer els oòcits o embrions a una concentració determinada de crioprotector penetrant. Normalment, s'utilitza una combinació de EG, DMSO o 1,2-propanediol (PROH). Seguidament, hi ha una breu exposició ( $\leq 1$  min) a altes concentracions de crioprotectors no penetrants abans de carregar-les a tot un seguit de microenvasos com el *Cryotop* (Kuwayama *et al.*, 2005), el *Cryoloop* (Lane *et al.*, 1999), palleta *Hemi* (Vanderzwalmen *et al.*, 2003) i el *Flexipet* (Liebermann *et al.*, 2002), en un volum molt petit (0.1-2 ml) per tal de facilitar al màxim el refredament ràpid (Figura 4).



**Figura 4.** Microenvasos per carregar oòcits o embrions en el mètode de vitrificació.  
(Modificat de: Saragusty *et al.*, 2011)

La ràpida reducció de la temperatura ( $>10000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) s'aconsegueix mitjançant l'exposició immediata a nitrogen líquid, ja sigui en un sistema tancat o obert. Els sistemes tancats estan destinats a mantenir les mostres separades físicament del nitrogen líquid durant tot el procediment de refredament, emmagatzemament i escalfament; mentre que, els sistemes oberts permeten el contacte directe entre la mostra i el nitrogen líquid. És important destacar que, per a la descongelació de les mostres vitrificades és necessari un escalfament ràpid (equivalent al ràpid refredament), seguit d'una rehidratació gradual utilitzant estratègies similars a les emprades després de la congelació convencional (Edgar *et al.*, 2012).

## 2. OBJECTIVES

The main objective of this review is to obtain a wide knowledge about cryopreservation in the field of reproduction and development, mainly oocyte and embryo cryopreservation. Specific objectives are to give a comparison between the mostly used methods to carry out this technique and, to compare two types of cryopreservation, the first one based on oocytes and the second one on embryos. In addition, the present dissertation aims to provide a comprehensive source of information about cryopreservation of oocytes and embryos.

## 3. METODOLOGIA

Aquesta revisió introdueix l'estat actual de la tècnica de la criopreservació d'òocits i d'embrions, incloent els diferents mètodes que s'utilitzen, els efectes que se'n deriven i la seguretat d'aquesta metodologia. A més a més, es fa una discussió comparativa sobre els mètodes que s'utilitzen per criopreservar oòcits i embrions; i, sobre la criopreservació d'aquests dos tipus de mostres.

Per a dur a terme aquesta revisió, es va realitzar una recerca bibliogràfica, principalment, a la base de dades *PubMed*. També es va buscar informació a altres fonts, com per exemple a *Google Academics* o a *Medline*. Les primeres cerques es centraven bàsicament en revisions àmplies sobre el tema objecte d'estudi. Els criteris de cerca van ser els següents: (i) human; cryopreservation, (ii) human; sperm; cryopreservation (iii) human; oocyte; cryopreservation, (iv) human; oocyte; vitrification, (v) human; embryo; cryopreservation, (vi) human; embryo; vitrification, (vii) human; embryo and oocyte cryopreservation (viii) comparison; cryopreservation. En aquestes recerques es va aplicar la restricció de "reviews", ja que, eren els articles d'interès per tal de realitzar el treball. Es van seleccionar aquelles revisions publicades dins del període del 2000 fins l'any 2015; aquests articles de revisió van ser analitzats exhaustivament i es va extreure informació de les parts més rellevants. A més a més, també van ser analitzats articles de temes específics interessants que es trobaven en les referències d'aquestes revisions. Finalment, es van llegir una altra vegada els diferents articles per tal de fer un millor resum i obtenir una millor comprensió del tema, la qual va servir per redactar el treball.

Durant la recerca d'informació, així com al llarg de la redacció de la memòria del treball, amb l'ajuda de la meua tutora, es va anar centrant el tema i es van anar fent les discussions i modificacions oportunes de les diferents parts del treball per tal d'assolir la millor presentació possible. L'última etapa va consistir en la lectura detallada de tota la memòria ja completa, i, en la introducció de les correccions i les modificacions finals suggerides pel tutor.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els oòcits i embrions es poden obtenir en diferents etapes del seu procés de maduració mitjançant qualsevol d'aquestes tècniques: 1) després de l'ovulació natural o induïda químicament; 2) per recollida d'òvuls duta a terme transabdominalment, transvaginalment o transrectalment, es pot fer durant el cicle estrogènic natural o a continuació de l'estimulació química per causar la superovulació; 3) després d'una ovariectomia a causa de problemes de salut o bé com a mètode anticonceptiu; i, 4) després de la fecundació, ja sigui natural o artificial (ex. Inseminació artificial), els embrions es poden trobar en diferents estadis de desenvolupament anteriors a la implantació (zigot, segmentació o blastocist). Els oòcits recollits es poden trobar en qualsevol estadi del seu desenvolupament, com per exemple: en estadi de fol·licle primordial, preantral o antral, presentant en cada cas uns determinats requeriments específics (Saragusty *et al.*, 2011).

### 4.1. CRIOPRESERVACIÓ D'EMBRIONS HUMANS

Els primers treballs sobre la criopreservació d'embrions en ratolí van ser publicats per Whittingham (1971), Whittingham *et al.* (1972) i Wilmut (1972), dos dècades més tard que Polge *et al.* (1949) publicassin els seus resultats sobre la criopreservació espermàtica en aus. A mitjans dels anys vuitanta ja es va incorporar en humans la criopreservació d'embrions com a procediment habitual en les TRA, i això va donar lloc a milers de nens nascuts fins avui dia. El 1983 Trounson i Mohr van publicar el primer embaràs en humans a partir d'embrions primerencs criopreservats. El primer naixement, a tot el món, es va publicar l'any següent (Zeilmaker *et al.*, 1984). El primer naixement a Espanya es va aconseguir quatre anys més tard (Veiga *et al.*, 1987) del primer naixement al món. Des de llavors, les diferents tècniques han anat evolucionant i han donat lloc a la consecució d'embarassos a partir d'embrions en diferents estadis embrionaris, tant amb la congelació lenta com amb la vitrificació (Solé *et al.*, 2008).

Des de fa molts anys, les etapes preferents del desenvolupament d'embrions humans, per tal de criopreservar-los, són l'etapa de zigot i els primers estadis de desenvolupament (estadi de pronucli, dia 1; i estadis de segmentació primerencs, dia 2 o dia 3). La criopreservació de blastocists va caure en desús, ja que, només un 25% dels zigots eren capaços d'arribar a l'estadi de blastocist en un cultiu habitual *in vitro* i, en general, a causa de les baixes taxes d'embaràs obtingudes (Gardner *et al.*, 2003). Tot i això, la importància de la criopreservació dels blastocists ha augmentat en els últims 8-10 anys.

La criopreservació d'embrions i zigots permet decidir la transferència d'un nombre adequat d'embrions i, al mateix temps, ofereix la possibilitat de fer nous intents si hi ha embrions sobrants sense la necessitat de realitzar un nou cicle complet de FIV. L'eficiència en els cicles de criotransferència és determinant per l'obtenció de bones taxes d'embaràs. El mètode de fecundació (FIV o Injecció intracitoplasmàtica -ICSI-) sembla que no influeix en els resultats de la criotransferència, independentment de l'estadi embrionari triat (Solé *et al.*, 2008).

La criopreservació d'embrions està indicada per a qualsevol dona en l'edat reproductiva que tingui un alt risc de desenvolupar insuficiència ovàrica en un futur, per tant, inclou totes aquelles dones que s'han sotmès a quimioteràpies gonadotòxiques, radioteràpies, tractaments

relacionats amb malalties sistèmiques no malignes i a qualsevol cirurgia que afecti a l'ovari. Així doncs, la criopreservació embrionària és una opció especialment important per les dones que presenten càncer i han de posposar la concepció fins la resolució d'aquesta malaltia primària i, també, per dones que per qualsevol altre motiu tenen la seva funció reproductora afectada.

Un dels càncers més freqüents diagnosticats en dones en edat reproductiva és el càncer de pit. En dones joves es manifesta amb una alta prevalença d'infiltració ductal i la majoria de pacients són sotmeses a quimioteràpia sistèmica, la qual té efectes gonadotòxics reconeguts (Rodríguez-Wallberg i Oktay, 2012). Les dones amb aquesta malaltia tenen l'opció de preservar la seva fertilitat pel procés de criopreservació el qual implica l'estimulació ovàrica, la recuperació d'òcits i la FIV. Tot aquest procés sol durar de 2 a 6 setmanes i, com que, generalment, aquestes dones tenen un interval de temps de 2 a 8 setmanes entre la cirurgia i l'inici del tractament quimioterapèutic adjuvant, és factible que es sotmetin a una hiperestimulació ovàrica controlada. Com que aquest tipus de càncer és estrogènic-depenent i els estrògens són considerats possibles carcinògens, l'augment dels nivells d'estradiol no és desitjat en dones diagnosticades amb aquest tipus de càncer. A més, l'augment d'aquesta hormona és directament proporcional al nombre de fol·licles ovàrics induïts a madurar (Bedoschi i Oktay, 2013). Per aquest motiu s'han desenvolupat protocols alternatius i més segurs que inclouen procediments d'estimulació amb tamoxifé (anàleg dels receptors estrogènics) o inhibidors d'aromatases (responsable d'un pas clau en la biosíntesi d'estrògens) que es poden combinar amb l'administració de gonadotropines, per tal de reduir la producció d'estrògens (Reddy i Oktay, 2012). Recentment, s'ha vist que la utilització de letrozol en combinació amb gonadotropines, enlloc de tamoxifé, és més eficient i està associada a un major nombre d'òcits obtinguts i fecundats (Azim *et al.*, 2008).

El càncer endometrial és un altre tipus de càncer maligne estrogènic-depenent que es pot manifestar en dones en edat reproductiva. Com que algunes pacients no es sotmetran al tractament conservador (histerectomia abdominal i ooforectomia bilateral) o no respondran al tractament amb progestina, la solució serà un tractament quirúrgic i, per això, la criopreservació embrionària per tal de preservar la fertilitat pot ser una possibilitat abans de la intervenció. Igual que en el cas anterior, l'augment dels nivells d'estradiol no és adequat en aquest tipus de càncer; així doncs, en el protocol d'estimulació ovàrica s'utilitzen inhibidors d'aromatases, els quals redueixen els nivells d'estrògens.

Normalment, abans d'iniciar els protocols de criopreservació embrionària, es duu a terme l'estimulació ovàrica mitjançant la utilització d'antagonistes de la hormona alliberadora de gonadotropines (GnRH) (Von Wolff *et al.*, 2011). S'usen aquests antagonistes i no uns altres degut a que estan associats a un baix risc de patir el síndrome d'hiperestimulació ovàrica (OHSS). Aquest risc també es pot reduir desencadenant la maduració final dels òcits a través d'agonistes de la GnRH (Oktay *et al.*, 2010a); però, l'ús d'agonistes de la GnRH pot accelerar l'interval de recuperació d'òcits de les pròximes menstruacions, així com la formació residual de pòlips ovàrics (Bedoschi i Oktay, 2013).

Alternativament, els òcits immadurs a criopreservar es poden obtenir d'un cicle no estimulat i es poden fecundar seguidament de la maduració *in vitro* (MIV), tot i que, l'eficàcia d'aquest



mètode en comparació amb la congelació d'embrions utilitzant oòcits madurs encara ha de ser determinada. D'altra banda, enlloc de descartar la fracció d'oòcits immadurs recuperats durant un cicle de FIV, aquests oòcits amb la vesícula germinal es podrien sotmetre a MIV per augmentar el rendiment dels embrions en els cicles de preservació de la fertilitat (Oktay *et al.*, 2010b).

#### **4.1.1. CONGELACIÓ LENTA O CONVENCIONAL**

Pel que fa als embrions en estadis de desenvolupament primerencs criopreservats mitjançant la congelació lenta, després del procés de descongelació es consideren viables els que contenen, com a mínim, la meitat dels seus blastòmers inicials de manera intacta. La pèrdua moderada de cèl·lules no influeix significativament la implantació. Edgar *et al.* (2012) van observar que incrementant la concentració de sacarosa (de 0.1M a 0.2M) del medi de criopreservació, augmentava significativament la taxa de supervivència d'aquestes cèl·lules i també la proporció d'embrions completament intactes (54.6% enfront 80.5%). Aquesta modificació del mètode de congelació lenta, juntament amb l'increment de concentració de sacarosa, ha produït resultats que són equivalents als millors resultats obtinguts mitjançant la vitrificació (Konc *et al.*, 2014).

Pel que fa als blastocists, la solució criopreservant més utilitzada en el mètode de congelació lenta és la combinació de glicerol i sacarosa. Les taxes de supervivència registrades amb un mínim d'un 50% de cèl·lules de la massa interna i cèl·lules del trofoblast viables estan al voltant del 69-98% i, les taxes d'implantació oscil·len del 16 al 30% (Surrey *et al.*, 2010). Els resultats de la bibliografia de que es disposa fins al moment, indiquen que la velocitat del desenvolupament embrionari té influència sobre la taxa de supervivència (Konc *et al.*, 2012). L'expansió dels blastocists congelats-descongelats es considera un bon senyal de supervivència, habitualment, el 70-80% d'aquests blastocists s'expandeixen. En un estudi realitzat per Konc *et al.* (2012), basant-se en més de 400 embrions criopreservats, no es van trobar diferències entre els grups d'embrions congelats i descongelats en el dia 3 i en el 5 en referència a les taxes de supervivència, d'implantació i d'embaràs; malgrat que en el grup gestant es va observar una taxa d'implantació significativament més alta en els blastocists del dia 5.

#### **4.1.2. VITRIFICACIÓ**

Embrions en estadis primerencs de desenvolupament han estat vitrificats amb èxit utilitzant solucions de DMSO, EG, DMSO + sacarosa, EG + sacarosa i DMSO + EG + sacarosa. S'han aconseguit taxes de supervivència d'un 60-80% amb almenys un 50% dels seus blastòmers originals intactes i unes taxes d'embaràs del 10-15% (Fahy *et al.*, 2007). Mitjançant una major velocitat de refredament, com permet el mètode de la vitrificació i, utilitzant uns sistemes especials d'emmagatzemament es milloren les taxes de supervivència (90%) i d'embaràs (25-60%). Malgrat aquests resultats, es va concloure que, en general, la vitrificació no estava associada a una major probabilitat d'embaràs enfront de la congelació lenta, tot i que, s'observava una major taxa de supervivència després de la descongelació en el cas d'embrions segmentats (*cleavage embryos*) i en estadi de blastocist (Kolibianakis *et al.*, 2009).

Pel que fa a la vitrificació de blastocists, la solució criopreservant més utilitzada és una barreja de EG i DMSO. Recentment, s'han obtingut unes millors taxes de supervivència (70-99%) i d'implantació (20-50%) emprant diferents sistemes d'emmagatzemament que permeten una congelació ultraràpida utilitzant petits volums de solució crioprotectora (Konc *et al.*, 2014).

#### **4.1.3. EFECTES DE LA CRIOPRESERVACIÓ SOBRE ELS EMBRIONS HUMANS**

Hi ha diversos factors intrínsecs que influencien el potencial d'implantació dels embrions primerencs, com són la qualitat de l'embrió en fresc abans de la criopreservació (sobretot el temps, el ritme de divisió i la simetria de les cèl·lules) i el percentatge de cèl·lules supervivents després del procés de congelació-descongelació (Solé *et al.*, 2008).

Els factors més determinants per la supervivència del blastocist són l'estadi en el qual es troba (primerenc o expandit *-hatched-*) i la seva qualitat morfològica. Com més expandit és el blastocist, més possibilitats hi ha que es formi gel al seu interior, fet que es tradueix en una menor supervivència (Solé *et al.*, 2008).

D'una banda, a diferència dels espermatozoides, el fet que els embrions siguin diploides pot ser avantatjós ja que una ploïdia estable tendeix a augmentar la resistència de les cèl·lules a factors mutagènics i factors estressants no específics. D'altra banda, els embrions tenen cèl·lules que es divideixen activament, la qual cosa pot fer que l'aparell genètic sigui més vulnerable a factors extrems en comparació als espermatozoides (Kopeika *et al.*, 2014).

L'efecte de la criopreservació sobre la integritat del DNA en embrions humans s'ha pogut avaluar en un estudi realitzat per Li *et al.* (2012) en el qual es mostra que, la congelació lenta causa una disminució en la integritat del DNA en comparació amb el grup control d'embrions frescos; en canvi, la vitrificació no causa cap efecte. Tot i els resultats obtinguts, no és possible establir si aquests canvis són deguts directament al procés de criopreservació o bé són secundaris al procés d'apoptosi (Li *et al.*, 2012).

#### **4.2. CRIOPRESERVACIÓ D'OÒCITS HUMANS**

Tot i els nombrosos estudis realitzats sobre la criopreservació d'oòcits, encara no existeix un mètode que permeti predir el desenvolupament potencial òptim dels oòcits. No obstant això, s'ha descrit que la qualitat dels oòcits és un dels principals factors determinants en la criopreservació, l'aplicació de les tècniques de FIV, la supervivència embrionària, l'establiment i manteniment de la gestació, el desenvolupament fetal, etc. (Saragusty *et al.*, 2011).

També es poden criopreservar oòcits immadurs en l'estadi de vesícula germinal (oòcits estacionats en la profase I) perquè aquests encara no tenen el fus meiótic format i, a més a més, presenten una membrana plasmàtica més permeable. S'ha suggerit que aquests oòcits podrien ser més resistents al dany causat pel refredament que els oòcits en metafase II (Rodríguez-Wallberg & Oktay, 2012).

La finalitat última de congelar els oòcits és que després de ser descongelats puguin ser fecundats mitjançant alguna de les tècniques específiques de fecundació assistida, com la FIV o l'ICSI. Per tant, es vol que la criopreservació d'oòcits esdevingui una opció prometedora per a la preservació de la fertilitat (Rodríguez-Wallberg & Oktay, 2012).

La primera gestació en humans a partir d'oòcits criopreservats mitjançant el mètode de congelació convencional va ser registrada el 1986 (Chen, 1986); però, anteriorment, ja s'havia aconseguit en altres espècies com per exemple el ratolí (Whittingham, 1977) i la rata (Kasai *et al.*, 1979). En canvi, el primer embaràs en humans a partir d'oòcits criopreservats a través de la vitrificació, va ser registrada tretze anys més tard, l'any 1999 (Kuleshova *et al.*, 1999). Al voltant del 2003, un grup d'investigadors japonesos va realitzar una sèrie de modificacions importants als protocols de vitrificació (Katayama *et al.*, 2003). Van crear un dispositiu especialment construït per tal d'aconseguir unes taxes de refredament extremadament ràpides, anomenat *Cryotop*, amb l'objectiu d'evitar els problemes relacionats amb el refredament i amb la desorganització del citoesquelet. A través d'aquest nou mètode, es van obtenir unes taxes de supervivència oocitària molt elevades, després d'haver descongelat els oòcits i, conseqüentment, millors taxes de gestacions (Kuwayama M, 2007). L'eficiència en la vitrificació d'oòcits ha fet possible l'establiment actual de bancs d'oòcits en programes de donants (Cobo *et al.*, 2010).

La criopreservació oocitària és molt diferent en comparació amb l'espermàtica i l'embrionària. El volum dels oòcits és molt més gran que el dels espermatozoides, fet que fa disminuir la ràtio superfície/volum i, en conseqüència, els fa molt sensibles al refredament i altament susceptibles a la formació de gel intracel·lular (Saragusty *et al.*, 2011). Els oòcits en estadi MII tenen una membrana plasmàtica amb un coeficient baix de permeabilitat, la qual cosa, provoca una disminució en el moviment dels crioprotectors i de l'aigua. A més, estan limitats per la zona pel·lúcida, la qual també actua de barrera enfront la solució de crioprotectors i l'aigua. Però aquesta barrera pot solidificar a causa de la criopreservació, de manera que, l'espermatozoide no pot penetrar l'oòcit, és a dir, no es pot dur a terme la fecundació (Mavrides i Morroll, 2005). Tot i això, aquest problema es pot solucionar mitjançant la injecció intracitoplasmàtica (ICSI) o la inserció espermàtica a una subzona. La zona pel·lúcida també es pot veure afectada a causa de l'alliberament de grànuls corticals prematurs, la formació dels quals és induïda pel procés de criopreservació oocitària (Ghetler *et al.*, 2006; Cotichio *et al.*, 2010). Cal remarcar també que, els oòcits tenen una alta concentració lipídica al citoplasma que augmenta la sensibilitat a la refrigeració. A més a més, tenen menys microtúbuls d'actina submembranosos, fent així la membrana menys robusta. El procés de criopreservació sol causar una desorganització del citoesquelet i anormalitats cromosòmiques i en el DNA. El fus meiótic, format en la fase MII, és molt sensible a la refrigeració, per tant, es pot veure compromès durant la criopreservació (Citotti *et al.*, 2009). A més a més, els oòcits són molt més susceptibles a les espècies reactives d'oxigen (ROS) (Gupta *et al.*, 2010). A diferència dels oòcits, els embrions són menys sensibles al refredament, ja que, molts dels paràmetres esmentats anteriorment varien després del procés de fecundació (Saragusty *et al.*, 2011).

Al llarg del temps s'han anat introduint diverses modificacions en el procediment de criopreservació en ambdós mètodes, és a dir, tant en el cas de la congelació convencional com en el de la vitrificació. Per exemple, l'increment de concentració de sacarosa (de 0.1 a 0.3M que ha comportat un augment en les taxes de deshidratació, de supervivència i de fecundació dels oòcits en MII (Konc *et al.*, 2014). Altres modificacions, com un increment de temperatura en l'equilibrament previ a la congelació amb la solució crioprotectora, la inducció de la formació de cristalls de gel en el medi extracel·lular entre els -5°C i -7,5°C (fenomen anomenat *seeding*), la immersió dels embrions en el nitrogen líquid, el reemplaçament de sodi per colina

en el medi, o bé, la injecció directa de sacarosa a l'interior del citoplasma de l'oòcit, també han comportat un augment en la taxa de supervivència oocitària (Konc *et al.*, 2014).

#### **4.2.1. CONGELACIÓ LENTA O CONVENCIONAL**

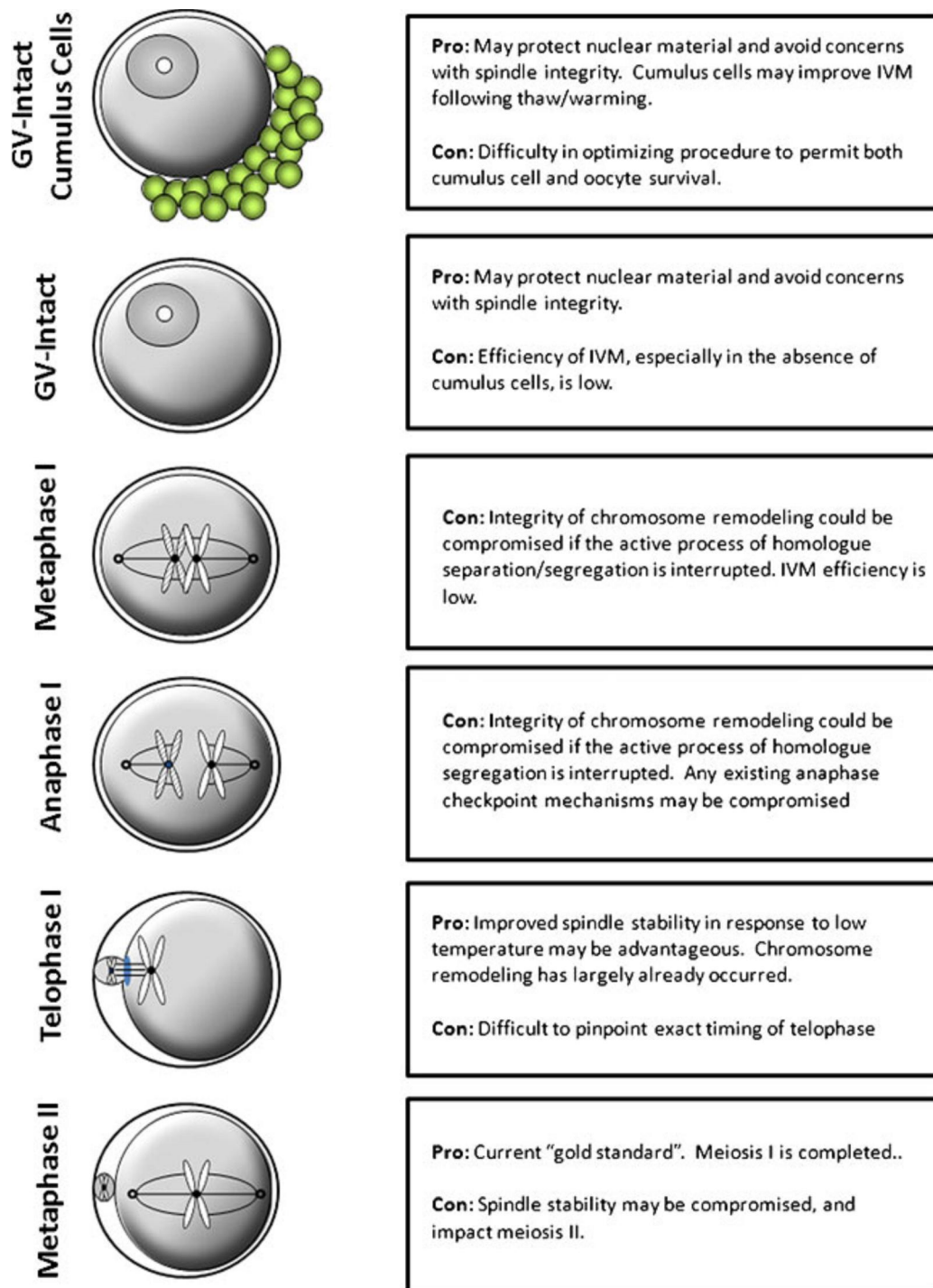
S'han obtingut taxes de fecundació comparables amb oòcits frescos (83%) i criopreservats (76%), però, observant-se un creixement més lent en el grup dels que havien estat congelats, encara que, les taxes d'implantació fossin similars (frescos: 11-18%; congelats: 7-15%); aquests resultats mostren una diferència significativa en embrions en estadi de 2 cèl·lules entre els oòcits frescos i els congelats ( $P < 0.05$ ) (Konc *et al.*, 2008). Els oòcits analitzats immediatament després de la descongelació presentaven desorganitzacions severes o la desaparició del fus meiótic; tot i això, cultivant els oòcits durant 1-3 hores després de la descongelació, s'observà que el fus meiótic podia tornar a polimeritzar (Borini *et al.*, 2010). Konc *et al.* (2012) van investigar la dinàmica del desplaçament del fus meiótic en oòcits humans criopreservats a través d'un aparell anomenat Poloscope® i, els seus resultats indicaren que el fus no sempre es torna a formar en la seva posició original dins l'oòcit. Després de descongelar i cultivar els oòcits, es va poder visualitzar el fus en el 84,3% dels casos, però, es va trobar que en la meitat del oòcits (53%) el fus s'havia reconstruït en una nova localització diferent de l'original.

#### **4.2.2. VITRIFICACIÓ**

En el mètode de la vitrificació, la solució més utilitzada consisteix en una barreja de crioprotectors penetrants (2.7M EG i 2.1M DMSO) i no penetrants (0.5M sacarosa). Les noves dades obtingudes a partir de la tècnica de vitrificació millorada en certs aspectes, com per exemple la disminució de volum de medi, mostren un increment en les taxes de supervivència posteriors a la descongelació i, també, en les taxes de fecundació, les quals són comparables amb les dels oòcits frescos del grup control (Konc *et al.*, 2014).

#### **4.2.3. EFECTES DE LA CRIOPRESERVACIÓ SOBRE ELS OÒCITS HUMANS**

La criopreservació té efectes sobre el genoma de l'oòcit; concretament, diferents estudis demostren que els oòcits criopreservats pel mètode de congelació lenta no són capaços de mantenir un fus meiótic normal, sense cap variació (Huang *et al.*, 2006; Larman *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2009a; Martínez-Burgos *et al.*, 2011). Això és degut a que a baixes temperatures, la tubulina es despolimeritza i, conseqüentment, l'estructura de suport del fus meiótic, la qual manté els cromosomes alineats a la placa metafàsica, es dissocia. El fus meiótic és important per tal que es doni una correcta segregació cromosòmica durant el procés de maduració dels oòcits (Rodríguez-Wallberg i Oktay, 2012). Tanmateix, s'ha descrit que el fus meiótic es pot regenerar després d'un procés de congelació-descongelació (Tamura *et al.*, 2013). El temps òptim per a la regeneració post-congelació (*post-freezing*) sembla ser que varia depenent de diversos factors, com ara el mètode de criopreservació utilitzat, la qualitat inicial dels oòcits, l'edat del pacient, el mètode d'avaluació del fus i, també, segons l'espècie (Kopeika *et al.*, 2014). De totes maneres, una alternativa podria ser que, enlloc d'utilitzar els oòcits en MII s'agafessin en un altre estadi de la meiosi on el fus mostri una millor integritat, o bé, en un estadi on es pugui suportar millor l'estrès tèrmic o altres problemes (Clark i Swain, 2013). A la següent figura es mostren diferents estadis de la meiosi amb els seus respectius avantatges i inconvenients:

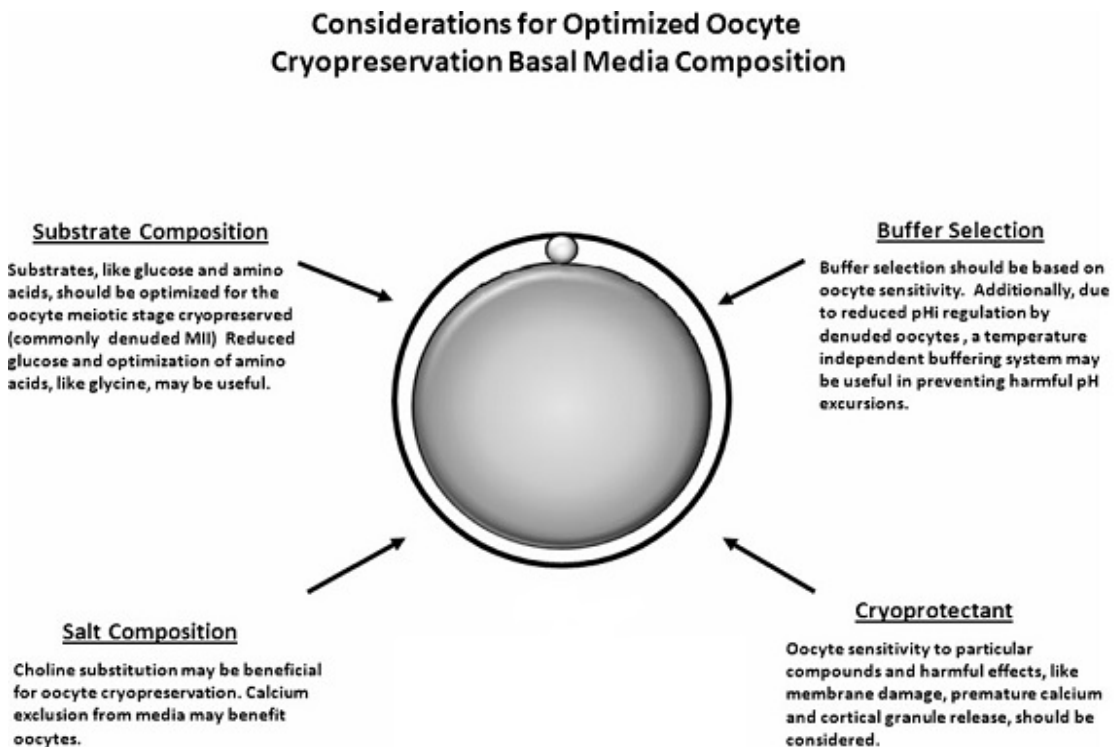


**Figura 5.** Estadis de la meiosi en oòcits i els seus respectius avantatges i inconvenients (Clark i Swain, 2013)

Es podrien criopreservar, per exemple, els oòcits intactes amb vesícula germinal (en estadi de profase I), sense un fus meiótic perceptible i que tenen tot el material genètic dins l'embolcall nuclear. Aquests podrien oferir menys danys cel·lulars causats per la criopreservació i una millora en la supervivència dels oòcits. Però, estudis recents, on no s'han obtingut bons resultats, indiquen la dificultat de criopreservar els oòcits en aquest estadi (Clark i Swain, 2013). No obstant això, els oòcits en profase I ofereixen un altre benefici perquè, com que es poden obtenir de cicles no estimulats o mínimament estimulats, no és necessari sotmetre la

pacient a estimulacions hormonals i, d'aquesta manera, no s'exposa als efectes perjudicials que poden comportar aquests tractaments. En el procés de criopreservació, aquests oòcits han de passar per un procés de maduració in vitro. S'ha comprovat que els oòcits criopreservats maduren menys eficientment que els frescos (Cao *et al.*, 2009a; Fasano *et al.*, 2012).

Un altre aspecte a tenir en compte per tal de millorar la criopreservació d'oòcits inclou el medi basal emprat (Figura 6), ja que, molts dels medis utilitzen una base amb tampons HEPES (àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetsulfònic) o MOPS (àcid 3-(N-morfolino)-propansulfònic), els quals són desenvolupats per a embrions en diferents estadis i contenen nivells elevats de glucosa. Però, els oòcits no tenen els mateixos requeriments que els embrions i, els nivells de glucosa o d'altres substrats, probablement, s'haurien d'ajustar (Clark i Swain, 2013). El medi basal és important perquè pot afectar la toxicitat dels crioprotectors. Un exemple seria el reemplaçament de la colina per clorur sòdic, el qual millora la taxa de refredament lent dels oòcits (Clark i Swain, 2013). S'ha comprovat que un pH inadequat pot afectar el desenvolupament embrionari, el metabolisme i el desenvolupament fetal; a més a més, també pot causar desorganitzacions al citoesquelet ens els oòcits. Per tant, és realment important mantenir un pH extern estable i apropiat durant el procés de criopreservació, al igual que seleccionar un tampó adequat basant-se en la sensibilitat dels oòcits enfront d'aquest. D'aquesta manera s'atenuen les variacions de pH i disminueix l'estrès resultant exercit sobre l'oòcit.

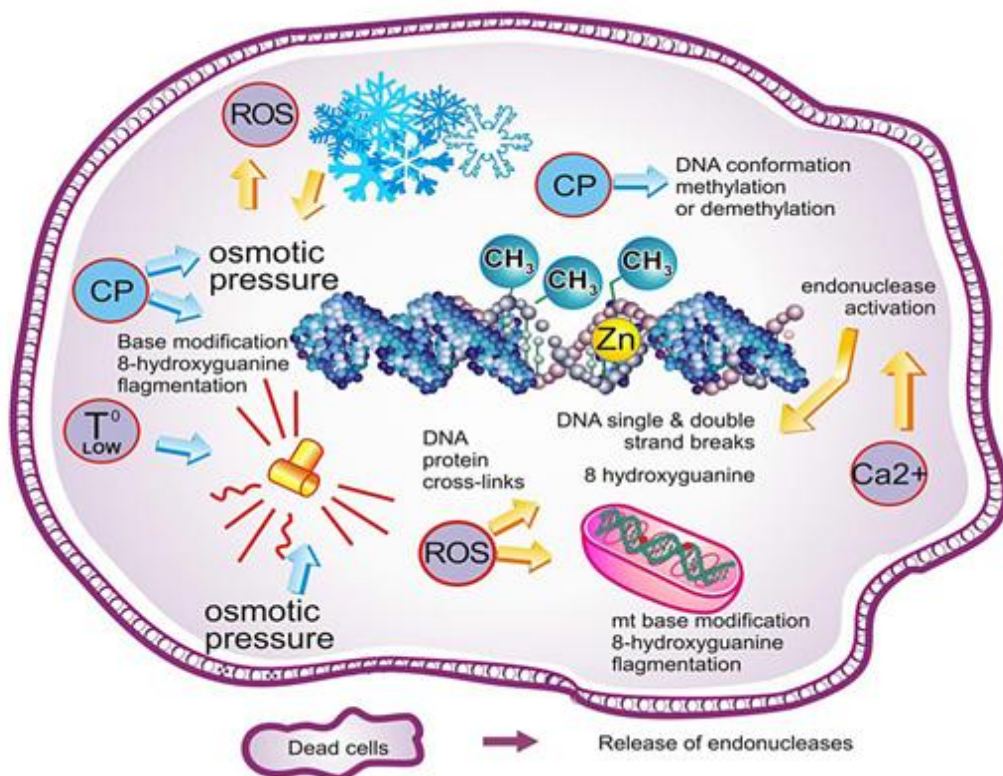


**Figura 6.** Consideracions sobre la composició del medi basal en la criopreservació d'oòcits.  
(Modificat de Clark i Swain, 2013)

La principal preocupació pel que fa als possibles efectes perjudicials sobre el fus meiótic de l'oòcit és la potencial pertorbació en l'alineament dels cromosomes, és a dir, la distribució

anòmala del material genètic que provoca un augment en les taxes d'aneuploidies (Sharma *et al.*, 2013). Un nombre limitat d'estudis en humans ha demostrat que, en principi, la taxa d'aneuploidies no augmenta després de la criopreservació d'òcits; per exemple, Cobo *et al.* (2001) van avaluar els cromosomes 13, 18, 21 i X a través d'una hibridació fluorescent in situ (FISH) de 21 blastocists humans provinents d'òcits criopreservats a través del mètode de congelació lenta i, van observar que en comparació amb el grup control aquests embrions no mostraven cap augment pel que fa a la taxa d'aneuploidies. Per tant, van concloure que el mètode de congelació lenta és segur, malgrat l'ús d'un nombre limitat d'òcits i d'embrions. En un altre estudi més recent realitzat amb embrions humans provinents d'òcits vitrificats es van trobar els mateixos resultats, és a dir, que la taxa d'aneuploidies no augmenta, en aquest estudi van utilitzar un mètode de detecció de cromosomes que analitza alhora els 23 parells de cromosomes autosòmics i el parell de cromosomes sexuals (Formen *et al.*, 2012). Referent a l'expressió gènica, hi ha evidències que suggereixen que, tant la congelació lenta com la vitrificació modifiquen el perfil d'expressió dels gens d'òcits humans en comparació amb els òcits no criopreservats -grups control- (Monzo *et al.*, 2012).

A la següent figura es mostren els mecanismes pels quals la criopreservació pot influenciar la integritat del genoma tant en òcits com en embrions.



**Figura 7.** Possibles mecanismes biològics de l'efecte de la criopreservació en el genoma.

**ROS**, espècies reactives d'oxigen; **CP**, crioprotectors; **T° low**, baixa Ta;

**Zn**, zinc incorporat al complex DNA-protamina. (Kopeika *et al.*, 2014)

El nombre total d'infants nascuts arreu del món a partir de tècniques de reproducció assistida (TRA) emprant òcits criopreservats és superior a 1500 (Rodríguez-Wallberg i Oktay, 2012). Tot i que aquesta pràctica pot afectar la integritat del genoma, els estudis indiquen que els nadons



concebuts a partir d'òocits criopreservats no presenten un major risc de resultats obstètrics adversos o d'anomalies congènites (Noyes *et al.*, 2009). A més a més, no es van trobar diferències en comparar la incidència d'anomalies cromosòmiques en embrions humans obtinguts a partir d'òocits frescos i òocits congelats (Cobo *et al.*, 2001). Malgrat els resultats prometedors, encara hi ha preocupació quant a la possibilitat que es puguin produir anomalies cromosòmiques, anomalies gèniques, malformacions d'òrgans o altres problemes de desenvolupament en la descendència (Konc *et al.*, 2014). Per tant, són necessaris més estudis de seguiment amb un nombre més significatiu de pacients per tal d'aclarir aquesta qüestió de vital importància.

Com s'ha comentat anteriorment, pels pacients que s'enfronten a la infertilitat a causa de tractaments químic/radioterapèutics, la criopreservació d'òocits és una de les poques opcions disponibles per mantenir la seva fertilitat potencial (Lore *et al.*, 2013). Per tant, des del punt de vista del *Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology*, del *Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*, i de la *American Society of Clinical Oncology*: (a) la criopreservació d'òocits és una promesa per a la preservació de la fertilitat femenina en el futur; (b) les recents modificacions sobre el protocol de criopreservació han resultat en millores quant a la supervivència oocitària, a la fecundació i a les taxes d'embaràs; (c) no s'ha observat un augment en les anomalies cromosòmiques, defectes en el naixement o dèficits en el desenvolupament en els nadons concebuts a partir d'òocits criopreservats; (d) la criopreservació d'òocits ja no s'hauria de considerar com una tècnica experimental i, hauria de ser recomanada per pacients amb càncer i portada a terme amb l'apropiat consentiment informatiu.

#### **4.3. SEGURETAT I ALTRES ASPECTES DE LA CRIOPRESERVACIÓ**

Actualment, els embrions i els òocits s'emmagatzemen normalment en nitrogen líquid; però, el potencial de contaminació del nitrogen líquid representa un perill real, ja que, els contenidors de congelació poden tenir fuites o poden trencar-se durant el procés de congelació. Això sol passar en el cas de sistemes oberts desenvolupats per a la vitrificació d'embrions i òocits. La incidència de contaminació creuada durant l'emmagatzematge del material biològic en nitrogen líquid i la subseqüent infecció creuada ha estat demostrada per Bielanski *et al.* (2000). Una vegada són criopreservats, tant els òocits com els embrions, poden romandre emmagatzemats durant llargs períodes de temps, ja que, no apareix cap deterioració perceptible (Saragusty *et al.*, 2011).

També s'ha descrit que alguns virus poden sobreviure a l'exposició directa al nitrogen líquid, com per exemple el virus de l'estomatitis vesicular, el de l'herpes simple, els adenovirus i el virus del papiloma humà (Bielanski *et al.*, 2000). A més a més, hi ha evidències de contaminació del nitrogen líquid per part d'altres microorganismes incloent un ampli rang d'espècies bacterianes i fúngiques (Konc *et al.*, 2014).

Existeixen una sèrie de possibles canvis i detalls relativament simples que poden ser aplicats als protocols de criopreservació per tal de minimitzar el potencial de contaminació o, directament, la contaminació creuada de les mostres biològiques emmagatzemades. Una d'aquestes modificacions podria ser que tots els pacients i donadors, les cèl·lules reproductives del quals seran criopreservades, haurien de sotmetre's a un cribatge (per exemple el virus de



l'hepatitis B -HBV-, el virus de l'hepatitis C -HCV-, el virus de la immunodeficiència humana -HIV-, etc.). Altres aspectes a tenir en compte serien, per exemple, la utilització de sistemes tancats enfront de sistemes oberts en el cas de la vitrificació o, el buidat i neteja periòdica del contenidor on s'emmagatzemen les mostres (Konc *et al.*, 2014).

Quan s'utilitzen procediments de preservació de la fertilitat, com en el cas de la criopreservació, és essencial fer un informe especialitzat per a les persones que es sotmeten a aquestes tècniques, ja que, tenen dret a saber les seves opcions sobre la preservació de la seva fertilitat, els riscos que pot comportar i els costos de cada procés. Per exemple, un aspecte legal controvertit és l'ús d'embrions després de la defunció de la persona; hi ha moltes diferències legals internacionals en quant a aquest tema; alguns països ho tenen prohibit completament i en d'altres hi ha unes normes més permissives, sovint encreuades amb la creença religiosa (Shah *et al.*, 2011). S'hauria de documentar en l'informe inicial si en aquesta situació la persona de la parella que encara viu pot utilitzar els embrions pel seu propi desig reproductiu o si es vol que siguin utilitzats per a la investigació, o bé, si es volen descartar.

#### **4.4. COMPARACIÓ ENTRE LA CRIOPRESERVACIÓ D'OÒCITS I D'EMBRIONS**

Fins ara, semblava que les taxes d'embaràs amb embrions criopreservats en pacients amb infertilitat eren menors que les taxes obtingudes amb embrions frescos. Però, una meta-anàlisi recent suggereix que les taxes de transferència d'embrions criopreservats són majors que les d'embrions frescos. Això s'ha atribuït a una millora en la sincronització de l'embrió amb l'endometri (Roque *et al.*, 2013).

L'embrió humà té, relativament, una alta permeabilitat als crioprotectors, en canvi, els oòcits tenen una membrana amb un coeficient més baix de permeabilitat. De fet, observant els coeficients de permeabilitat d'oòcits humans provinents de diferents dones s'ha vist que hi ha diferències individuals significatives en referència a la permeabilitat a l'aigua i als crioprotectors. A més, l'embrió és notablement més resistent al dany causat per la criopreservació que l'oòcit (Rodríguez-Wallberg i Oktay, 2012). Un altre avantatge de la criopreservació embrionària és que permet preservar tota la genètica complementària dels dos progenitors (Saragusty *et al.*, 2011).

La criopreservació d'oòcits ofereix flexibilitat als programes de reproducció assistida en els casos en que els cicles s'han d'interrompre per causes imprevistes (Gera *et al.*, 2010). Alguns exemples d'aquestes causes podrien ser: una reacció adversa a l'hiperestimulació hormonal, una receptivitat endometrial inapropiada, inhabilitat en produir esperma viable per part de la parella respectiva, etc. Aquest tipus de criopreservació redueix significativament la manipulació mèdica i la despesa econòmica dins un cicle de tractament de donació d'oòcits (Smith *et al.*, 2011). A més a més, l'habilitat de criopreservar oòcits durant un període de temps compatible amb les proves de detecció de possibles malalties infeccioses dels donants, augmentaria la protecció de les persones receptores. Per tant, això permetria la igualtat entre homes i dones en referència a la donació de gàmetes (Hammarberg *et al.*, 2008).

Com s'ha comentat anteriorment, la criopreservació oocitària podria reduir potencialment la despesa dels tractaments d'infertilitat, perquè no seria necessària l'estimulació externa amb gonadotropines, ni avaluacions pel desenvolupament fol·licular múltiple. Això passarà quan

aquest procediment, juntament amb la maduració in vitro d'oòcits humans, esdevingui un mètode rutinari d'ús ampli i presenti molt bons resultats quant a gestacions i els respectius nadons nascuts vius (Chian *et al.*, 2009). Aquest fet proporcionarà una opció viable per a aquelles persones que volen formar una família, però, tenen problemes d'infertilitat i que, actualment, no poden tractar-ho degut als elevats costos de les TRA habitualment emprades. A més a més, suposa un altre avantatge per a aquelles dones que vulguin posposar l'embaràs a edats més avançades, perquè, normalment, a aquestes edats disminueix la capacitat (viabilitat) dels oòcits de dur a terme un desenvolupament sense cap complicació. Per això, criopreservant els oòcits a edats més joves s'augmenta la possibilitat d'establir posteriorment un embaràs amb el propi material genètic en dones a una edat més avançada.

En un context clínic d'aplicació de les tècniques de FIV, la criopreservació d'embrions i d'oòcits fecundats podria suposar un avantatge enfront de la criopreservació d'oòcits en MII. Principalment, perquè d'aquesta manera s'eliminen els oòcits que no són capaços de dur a terme un desenvolupament correcte després de ser fecundats. Així mateix, si es criopreserven embrions, es poden seleccionar els "millors" en base a marcadors morfològics i del desenvolupament. Per aquests motius, la majoria de clíniques especialitzades en TRA prefereixen criopreservar embrions sobrants que es trobin en estadis primerencs del desenvolupament (2-8 cèl·lules), o bé, una mica més tard, quan es pot evidenciar que no hi ha cap anomalia en el desenvolupament d'aquell embrió.

La criopreservació d'oòcits suposa un avantatge respecte la criopreservació d'embrions, ja que, no implica tants dilemes morals, ètics i religiosos. A més a més, evita la síndrome d'hiperestimulació ovàrica.

#### **4.5. COMPARACIÓ ENTRE LA CONGELACIÓ LENTA I LA VITRIFICACIÓ**

La comparació entre aquests dos mètodes es farà per a diferents estadis de maduració de l'oòcit i de desenvolupament de l'embrió. D'una banda, els oòcits s'analitzaran en l'estadi de segona meiosi i en l'estadi pronuclear. D'altra banda, els embrions s'analitzaran en l'estadi de segmentació i en l'estadi de blastocist.

##### **4.5.1. OÒCITS EN MII**

La manera més vàlida de comparar els resultats obtinguts mitjançant el mètode de congelació lenta i el de vitrificació per a la criopreservació d'oòcits en MII, seria a través d'una avaluació de la seva eficiència relativa en un ambient únic en el qual el material biològic, la manipulació, i els mètodes de cultiu fossin els mateixos. Dos estudis (Grifo i Noyes, 2009; Noyes *et al.*, 2010) van comparar els resultats obtinguts a partir de les solucions més utilitzades en la vitrificació conjuntament amb un sistema tancat d'emmagatzemament (*Cryotop*) i, els resultats obtinguts a partir de la congelació lenta realitzada amb una solució que contenia PROH i sacarosa 0.3 M. Aquesta comparació va suggerir una supervivència equivalent i una tendència cap a la reducció del desenvolupament en el grup d'oòcits vitrificats. No obstant això, no es poden extreure conclusions relatives relacionades amb els resultats clínics. El mètode de congelació lenta utilitzat en aquest estudi podria no ser el més òptim i, en el mètode de vitrificació no es va utilitzar el protocol més habitualment emprat que fa servir un sistema obert, el qual proporciona taxes de congelació i descongelació més elevades (Edgar *et al.*, 2012). Tot i això,

d'acord amb un altre estudi, les taxes de supervivència i de desenvolupament van ser més elevades en la vitrificació d'òcits que no pas utilitzant el mètode de congelació lenta (Cao *et al.*, 2009b).

Un altre estudi prospectiu basat en els dos mètodes utilitzats per criopreservar òcits en MII mostra majors taxes de supervivència, fecundació, desenvolupament i gestacions clíniques en el grup d'òcits vitrificats (Smith *et al.*, 2010). Actualment, hi ha proves reproduïbles que reafirmen la conclusió que la vitrificació, descrita per primera vegada per Katayama *et al.* (2003), és capaç de preservar un desenvolupament potencial normal en òcits en MII humans. A més a més, segons aquest enfocament, es creu "a priori" que al voltant del 90% dels òcits vitrificats sobreviurà a la criopreservació (Edgar *et al.*, 2012). A diferència de la vitrificació, el mètode actual de congelació lenta sembla produir un impacte negatiu en el desenvolupament potencial i unes taxes de supervivència menors. Malgrat el fet que hi ha molt pocs estudis que comparin aquests dos mètodes, en general, les dades actuals indiquen que es pot afirmar que la vitrificació és la millor opció per criopreservar els òcits estacionats en la segona metafase de la meiosi, en termes d'eficàcia clínica.

#### **4.5.2. OÒCITS EN ESTADI PRONUCLEAR (ZIGOT)**

Experiències recents suggereixen que es podrien obtenir millors taxes d'èxit utilitzant el mètode de congelació lenta per a la criopreservació d'òcits en estadi pronuclear, enlloc de la criopreservació d'embrions en estadis primerencs de segmentació. Kuwayama *et al.* (2005) van demostrar l'efectivitat i la reproductibilitat de la vitrificació en un extens estudi en que van vitrificar 5.881 òcits i congelar lentament 1.944 òcits, ambdós en estadi pronuclear, utilitzant el *Cryotop* juntament amb els crioprotectors EG, DMSO i sacarosa. Els resultats que varen obtenir en aquest estudi permeten observar que les taxes de supervivència, de segmentació i de blastulació són més elevades quan s'utilitza el mètode de vitrificació (100, 93 i 56%, respectivament) que el de congelació lenta (89, 90 i 51%, respectivament) per criopreservar els òcits en estadi de pronucli.

Encara que hi ha alguna evidència recent que afirma que les taxes d'implantació i gestació obtingudes a partir d'òcits congelats lentament en l'estadi de pronucli són equivalents a les taxes obtingudes amb òcits frescos (Edgar *et al.*, 2012), també hi ha estudis que indiquen que el desenvolupament embrionari es pot veure compromès mitjançant el mètode de congelació lenta (Shapiro *et al.*, 2010). Les taxes de desenvolupament obtingudes després de la vitrificació són significativament més elevades que les obtingudes mitjançant la congelació convencional lenta (Kuwayama *et al.*, 2005). En resum, la vitrificació sembla ser que és el millor mètode per criopreservar òcits en aquest estadi de pronucli.

#### **4.5.3. EMBRIONS EN ESTADIS DE SEGEMENTACIÓ PRIMERENCS**

En considerar la criopreservació d'embrions, hi ha tota una sèrie de factors addicionals a tenir en compte que poden influenciar l'anàlisi de l'eficiència d'aquesta tècnica de reproducció assistida, tant utilitzant el mètode de congelació lenta com el de vitrificació (Edgar *et al.*, 2012). En primer lloc, cal dir que, en la majoria de casos, es seleccionen els "millors" embrions per a la criopreservació. En segon lloc, els criteris per congelar els embrions humans poden variar entre els diferents centres clínics, la qual cosa pot tenir finalment un determinat impacte

en els resultats que s'obtenen. Per exemple, un centre que només criopreserva els embrions de més alta qualitat esperaria obtenir taxes d'implantació elevades, en canvi, podria descartar potencial reproductiu que, tanmateix, altres clíniques aprofitarien. A més a més, a diferència de la criopreservació d'òocits i de zigots, la supervivència obtinguda després de la descongelació, en el cas de la criopreservació embrionària no és un fenomen del "tot o res", sinó que, un embrió pot sobreviure amb una proporció de les seves cèl·lules intactes, mentre que, altres cèl·lules del mateix embrió poden estar lisades; és a dir, la criosupervivència pot ser completa i parcial en el cas dels embrions (Edgar *et al.*, 2012).

En la comparació de la vitrificació enfront de la congelació convencional, utilitzant els protocols de DMSO/sacarosa, Mauri *et al.* (2001) van obtenir taxes elevades de supervivència (com a mínim amb un blastòmer viable) i d'implantació mitjançant el mètode de congelació lenta. Mentre que, un altre grup d'investigadors aconseguen el mateix, però, utilitzant la vitrificació (Vutyavanich *et al.*, 2008).

Utilitzant el mètode de vitrificació basat en una solució crioprotectora de EG/sacarosa, Rama Raju *et al.* (2005) van obtenir millors taxes de supervivència (95.3%) i d'implantació (14.9%) en comparació amb el mètode de congelació lenta (60 i 4.2%, respectivament). Encara que, val a dir que, en aquest darrer estudi, els resultats obtinguts a partir d'aquest últim mètode són els més baixos de tots els obtinguts en altres estudis que han estat revisats.

La vitrificació amb una solució de EG/DMSO/sacarosa d'embrions segmentats mostra un augment significatiu de la criosupervivència en comparació amb la congelació lenta (98% enfront de 91%), però, no hi ha diferències en les taxes d'embaràs (Kuwayama *et al.*, 2005). Malgrat que Wilding *et al.* (2010), en un estudi comparatiu similar dut a terme posteriorment, no van trobar diferències significatives en quant a les taxes de supervivència o d'implantació.

En resum, a partir de les evidències disponibles, sembla ser que els embrions segmentats que sobreviuen a la criopreservació tenen un potencial d'implantació similar al dels embrions frescos. La supervivència esdevé la consideració predominant quan es compara l'eficiència entre diferents mètodes de criopreservació. En general, com s'ha pogut observar en diferents estudis utilitzant el mètode de vitrificació, es poden aconseguir unes taxes de supervivència del 90% o majors; encara que, alguns estudis puntuals obtinguin pitjors resultats. En alguns estudis comparatius, els resultats obtinguts amb la vitrificació superen els de la congelació convencional; tanmateix, en altres estudis comparatius, alguns inclús amb taxes de supervivència molt elevades, s'obtenen resultats molt similars mitjançant el mètode de congelació lenta. És important destacar que, tots els estudis comparatius revisats utilitzen des de fa molt temps el protocol tradicional per a la congelació lenta; però, recentment, s'ha demostrat que utilitzant el protocol modificat del mètode de criopreservació convencional lenta s'obtenen millors resultats. Algunes de les modificacions realitzades, com per exemple la participació d'una sola etapa de deshidratació utilitzant PROH amb una major concentració de sacarosa (0.2M), han produït resultats que són equivalents als obtinguts mitjançant el mètode de vitrificació (Edgar *et al.*, 2012).

#### 4.5.4. EMBRIONS EN ESTADI DE BLASTOCIST

En un estudi on es comparava la criopreservació de blastocists mitjançant el mètode de congelació lenta amb el mètode de vitrificació, ambdós realitzats pel mateix centre, es van obtenir majors taxes de supervivència (100% enfront de 83.1%) i d'implantació (19.4% enfront de 7.4%) en el grup de blastocists vitrificats (Stehlik *et al.*, 2005); encara que la taxa d'implantació obtinguda amb el mètode de congelació lenta sembla ser significativament més baixa que les obtingudes per altres grups. En una anàlisi retrospectiva en que es van congelar lentament 189 blastocists i se'n van vitrificar 89, les elevades taxes d'embaràs es van associar amb la vitrificació en relació a la congelació lenta (Kuc *et al.*, 2010). En un estudi comparatiu dut a terme per Kuwayama *et al.* (2005), la supervivència dels blastocists vitrificats va ser lleugerament major (90%) que la dels blastocists criopreservats mitjançant la congelació lenta (84%); no obstant això, les taxes d'embaràs (53% enfront de 51%) no presentaven diferències significatives entre els dos mètodes.

De la mateixa manera que en el cas dels embrions en estadis de segmentació, sembla ser que els blastocists que sobreviuen a la criopreservació, tant amb el mètode de congelació convencional lenta com amb el de vitrificació, presenten taxes d'implantació similars a les de blastocists frescos. Actualment, la vitrificació està associada a una major criosupervivència, tot i que, molts grups que utilitzen el mètode de congelació lenta també han obtingut resultats comparables amb els de la vitrificació.

En resum, es pot afirmar que el principal mètode que s'utilitza actualment per criopreservar oòcits i embrions humans és la vitrificació. Però, és necessari continuar investigant per tal de millorar el mètode de congelació lenta, ja que, suposa menys problemes relacionats amb la seguretat en relació a l'emmagatzematge, el transport i les possibles conseqüències, a llarg termini, de l'exposició a altes concentracions de crioprotectors associades amb la vitrificació.

## 5. CONCLUSIONS

- ❖ Human embryo and gamete cryopreservation are a feasible option especially important in fertility preservation in case of risk.
- ❖ Embryo and oocyte cryopreservation are indicated mainly for women with cancer or autoimmune diseases and, for women with reproductive dysfunction due to other reasons.
- ❖ Embryo cryopreservation is nowadays widely used in assisted reproductive technologies (ART); however, oocyte cryopreservation is gaining importance in recent years.
- ❖ Embryos present various favorable characteristics, for instance high permeability to cryoprotectants or resistance to cell damage due to cryopreservation, that make them advantageous in front of oocytes when they are cryopreserved.
- ❖ Oocyte cryopreservation is a promising option for the future concerning fertility preservation because it has some advantages over embryo cryopreservation. The main benefit of oocyte cryopreservation is in the reduction of medical handling as well as economic costs involved in this process.
- ❖ Cryopreservation does not decrease the rates of implantation regarding the use of early stage embryos or blastocysts.
- ❖ Neither embryonic nor oocyte cryopreservation influence the health of the newborn conceived by these techniques. Thus, cryopreservation does not involve congenital abnormalities or adverse results.
- ❖ The principal method currently used to perform oocyte and embryo cryopreservation is vitrification.
- ❖ The slow freezing protocol is now being modified in order to achieve more successful outcomes. For this reason, more research must continue to get the same or higher rates of success as those offered by the vitrification method.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- **Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K** (2008). Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 2630–2635.
- **Bedoschi G, Oktay K** (2013). Current approach to fertility preservation by embryo cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 99(6), 1496-1502.
- **Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C** (2000). Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology*, vol. 40, no. 2, pp. 110–116.
- **Borini A, Levi Setti PE, Anserini P** (2010). Multicenter observational study on slow-cooling oocyte cryopreservation: clinical outcome. *Fertility and Sterility*, 94 (5), 1662–1668.
- **Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P, Cong L** (2009a). Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 19, 369–373.
- **Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P** (2009b). Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertility and Sterility*, 92, 1306–1311.
- **Casas I.** (2010). *A practical approach on boar sperm cryodamage. Morphofunctional and immunocytochemical study of cryopreserved boar sperm intended for use in artificial insemination* [tesis doctoral en línia]. Girona: Universitat de Girona. Departament de Reproducció, < <http://hdl.handle.net/10803/7642>> [Consulta: 17 abril 2015]
- **Chen C** (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, 1, 884–886.
- **Chian R, Gilbert L, Huang J, Demirtas E, Holzer H, Benjamin A, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL** (2009). Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. *Fertility and Sterility*, 91, 372–376.
- **Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A, Venturoli S** (2009). Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertility and Sterility*, 91, 2399–2407.
- **Clark NA, Swain JE** (2013). Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30, 865-875.
- **Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J** (2001). Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertility and Sterility*, 75, 354–360.
- **Cobo A, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A** (2010). Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human Reproduction*, 25, 2239-2246.
- **Coticchio G, Borini A, Distratis V, Maione M, Scaravelli G, Bianchi V, Macchiarelli G, Nottola SA** (2010). Qualitative and morphometric analysis of the ultrastructure of human oocytes cryopreserved by two alternative slow cooling protocols. *J Assist Reprod Gen*, 27, pp.131–40.
- **Dayong G, Critser JK** (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Journal* 41(4) from ILAR: Institute for Laboratory Animal Research, National Academy of Sciences, Washington. [http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarjournal/41\\_4/Mechanisms.shtml](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/41_4/Mechanisms.shtml)
- **Edgar DH, Gook DA** (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Human Reproduction*, 18 (5), 536-554.
- **Fahy GM, Rall WF** (2007). Vitrification: an overview. *Vitrification in Assisted Reproduction*, M. J. Tucker and J. Liebermann, Eds., *Informa Healthcare*, London UK.

- **Fasano G, Demeestere I, Englert Y** (2012). In-vitro maturation of human oocytes: before or after vitrification?. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29, 507–512.
- **Forman EJ, Li X, Ferry KM, Scott K, Treff NR, Scott RT Jr** (2012). Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertility and Sterility*, 98, 644–649.
- **Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB** (2003). Changing the start temperature and cooling rate in a slowfreezing protocol increases human blastocyst viability. *Fertility and Sterility*, 79 (2), 407–410.
- **Gera P, Tatpati L, Allemand M, Wentworth M, Coddington C** (2010). Ovarian hyperstimulation syndrome: steps to maximize success and minimize effect for assisted reproductive outcome. *Fertility and Sterility*, 94, 173–178.
- **Ghetler Y, Skutelsky E, Ben Nun I, Ben Dor L, Amihai D, Shalgi R** (2006). Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. *Fertility and Sterility*, 86, 210–216.
- **Grifo JA, Noyes N** (2009). Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertility and Sterility*, 93, 391–396.
- **Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT** (2010). Effect of vitrification and betamercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 93, 2602–2607.
- **Hammarberg K, Carmichael M, Tinney L, Mulder A** (2008). Gamete donors' and recipients' evaluation of donor counselling: a prospective longitudinal cohort study. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 48, 601–606.
- **Huang JY, Chen HY, Tan SL, Chian RC** (2006). Effects of osmotic stress and cryoprotectant toxicity on mouse oocyte fertilization and subsequent embryonic development in vitro. *Cell Preservation Technology*, 4, 149–160.
- **Jericho H, Wilton L, Gook DA, Edgar DH** (2003). A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Human Reproduction*, 18, 568–571.
- **Kasai M, Iritani A, Chang MC** (1979). Fertilization in vitro of rat ovarian oocytes after freezing and thawing. *Biology of Reproduction*, 21, 839–844.
- **Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E** (2003). High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertility and Sterility*, 80, 223–224.
- **Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC** (2009). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better?. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 21 (3), 270–274.
- **Konc J, Kanyo K, Varga E, Kriston R, Cseh S.** (2008). Births resulting from oocyte cryopreservation using a slow freezing protocol with propanediol and sucrose. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 54 (4-5), 205–210.
- **Konc J, Kanyo K, Kriston R, Zeke J, Cseh S** (2012). Freezing of oocytes and its effect on the displacement of the meiotic spindle: short communication. *The Scientific World Journal*, 2012, Article ID 785421, 4 pages.
- **Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somosköi B, Cseh S** (2014). Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction. *BioMed Research International*, 2014, 9 pages.



- **Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y** (2014). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction*, 21 (2), 209-227.
- **Kuc P, Kuczynska A, Stankiewicz B, Sieczynski P, Matysiak J, Kuczynski W** (2010). Vitrification vs. slow cooling protocol using embryos cryopreserved in the 5th or 6th day after oocyte retrieval and IVF outcomes. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 48, 84–88.
- **Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A** (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Human Reproduction*, 14, 3077–3079.
- **Kuwayama M** (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67, 73–80.
- **Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O** (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive BioMedicine Online*, 11, 608–614.
- **Larman MG, Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK** (2007). Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, 15, 692–700.
- **Leibo SP, Mazur P** (1971). The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology*, 8(5), 447-452.
- **Li L, Zhang X, Zhao L, Xia X, Wang W** (2012). Comparison of DNA apoptosis in mouse and human blastocysts after vitrification and slow freezing. *Molecular Reproduction Development*, 79, 229–236.
- **Lore A.W, Mangu P. B, Beck L. N, Magdalinski A. J, Partridge A. H, Oktay K** (2013). Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 31, no. 19, pp. 2500–2510.
- **Luvoni GC, Pellizzari P** (2000). Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology*, 53, 1529–1540.
- **Martínez-Burgos M, Herrero L, Megías D, Salvanes R, Montoya MC, Cobo AC, Garcia-Velasco JA** (2011). Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertility and Sterility*, 95, 374–377.
- **Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RL, Ferreira RC, Franco JG** (2001). Comparison of the cryopreservation of human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection with a slow cooling or an ultrarapid cooling procedure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18, 257–261.
- **Mavrides A, Morroll D** (2005). Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 118, 66–70.
- **Mazur P** (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*, 47, 347-369.
- **Mazur P, Leibo SP, Chu EH** (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*, 71(2), 345-355.
- **Monzo C, Haouzi D, Roman K, Assou S, Dechaud H, Hamamah S** (2012). Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Human Reproduction*, 27, 2160–2168.
- **Morris GJ, Acton E, Avery S** (1999). A novel approach to sperm cryopreservation. *Human Reproduction*, 14(4), 1013-1021.

- **Morris J** (2007). Asymptote guide to cryopreservation. 2nd ed. Cambridge: Asymptote Ltd. St. Johns Innovation Centre. [on-line]  
<http://www.asymptote.co.uk/cryo/Asymptote%20Guide%20to%20Cryopreservation.pdf>
- **Noyes N, Knopman J, Labella P, McCaffrey C, Clark-Williams M, Grifo J** (2010). Oocyte cryopreservation outcomes including pre-cryopreservation and post-thaw meiotic spindle evaluation following slow cooling and vitrification of human oocytes. *Fertility and Sterility*, 94, 2078–2082.
- **Noyes N, Porcu E, Borini A** (2009). Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 18, no. 6, pp. 769–776.
- **Oktay K, Turkcuoglu I, Rodriguez-Wallberg KA** (2010a). GnRH agonist trigger for women with breast cancer undergoing fertility preservation by aromatase inhibitor/FSH stimulation. *Reproductive BioMedicine Online*, 20, pp. 783–788.
- **Oktay K, Buyuk E, Rodriguez-Wallberg KA, Sahin G** (2010b). In vitro maturation improves oocyte or embryo cryopreservation outcome in breast cancer patients undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. *Reprod Biomed Online*, 20, pp. 634–638.
- **Paoli D, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L** (2013). Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Advances in experimental medicine and biology*, 791, 137-150.
- **Rama Raju GA, Haranath GB, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K** (2005). Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reproductive BioMedicine Online*, 11, 434–437.
- **Reddy J, Oktay K** (2012). Ovarian stimulation and fertility preservation with the use of aromatase inhibitors in women with breast cancer. *Fertility and Sterility*, 98, 1363–1369
- **Rodríguez Gómez L** (2005). Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO. *Tèsi doctoral*. Facultat de medicina, Universitat Autònoma de Barcelona.
- **Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K** (2012). Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, vol. 26, no. 3, pp. 391–405.
- **Roque M, Lattes K, Serra S, Sola I, Geber S, Carreras R, Checa MA** (2013). Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 99, pp.156–162.
- **Saragusty J, Arav A** (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction: The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*, 141, 1-19.
- **Shah DK, Goldman E, Fisseha S** (2011). Medical, ethical, and legal considerations in fertility preservation. *Internation Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 115, pp.11–15.
- **Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S** (2010). Embryo cryopreservation rescues cycles with premature luteinization. *Fertility and Sterility*, 93, 636–641.
- **Sharma RK, Azeem A, Agarwal A** (2013). Spindle and chromosomal alterations in metaphase II oocytes. *Reproduction Science*, 20, 1293–1301.
- **Smith GD, Motta EE, Serafini P** (2011). Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 23, 298-306.

- **Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, Alegretti JR, Motta EL** (2010). Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertility and Sterility*, 94, 2088–2095.
- **Solé M, Boada M, Veiga A** (2008). Criopreservació i tècniques de reproducció assistida. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia*, 59, 233-248.
- **Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O** (2005). Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online*, 11, 53–57.
- **Surrey E, Keller J, Stevens J, Gustofson R, Minjarez D, Schoolcraft WB** (2010). Freeze-all: enhanced outcomes with cryopreservation at the blastocyst stage versus pronuclear stage using slow-freeze techniques. *Reproductive BioMedicine Online*, 21 (3), 411–417.
- **Swain JE, Smith GD** (2010). Fertility cryopreservation. Recuperat 11 Maig de 2015, a [https://books.google.es/books?id=d3ZKJRsa344C&dq=cryoprotectants+swain&hl=ca&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.es/books?id=d3ZKJRsa344C&dq=cryoprotectants+swain&hl=ca&source=gbs_navlinks_s)
- **Tamura AN, Huang TT, Marikawa Y** (2013). Impact of vitrification on the meiotic spindle and components of the microtubule-organizing center in mouse mature oocytes. *Biology of Reproduction*, 89, 112.
- **Tilly JL, Niikura Y, Rueda BR** (2009). The current status of evidence for and against postnatal oogenesis in mammals: a case of ovarian optimism versus pessimism?. *Biology of Reproduction*, 80, 2–12.
- **Trounson A, Mohr L** (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305, 707-709.
- **Vajta G, Nagy ZP** (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproduction Biomedicine Online*, 12, 779–796.
- **Veiga A, Calderon G, Barri PN and Coroleu B** (1987). Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with less than 50% intact blastomeres. *Human Reproduction*, 2 (4), 321-323.
- **Von Wolff M, Montag M, Dittrich R, Denschlag D, Nawroth F, Lawrenz B** (2011). Fertility preservation in women: a practical guide to preservation techniques and therapeutic strategies in breast cancer, Hodgkin's lymphoma and borderline ovarian tumours by the fertility preservation network FertiPRO-TEKT. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 284, pp.427–435.
- **Vutyavanich T, Sreshthaputra O, Mongkolchaipak S, Wongtra-ngan S, Piromlertamorn W** (2008). Slow programmable and ultra-rapid freezing of human embryos. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 34, 457–463.
- **Whittingham DG** (1977). Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at K196 8C. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49, 89–94.
- **Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P** (1972). Survival of mouse embryos frozen to 2196 degrees and 2269 degrees C. *Science*, 178, 411–414.
- **Wilding MG, Capobianco C, Montanaro N, Kabili G, Di Matteo L, Fusco E, Dale B** (2010). Human cleavage-stage embryo vitrification is comparable to slow-rate cryopreservation in cycles of assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27, 549–554.
- **Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC** (1984). Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertility and Sterility*, 42, 293–296.