

CONGELACIÓN LENTA Y VITRIFICACIÓN

Cuando hacemos una Fecundación in vitro, normalmente generamos más óvulos (ovocitos) que en un ciclo natural en el sólo se produce uno cada vez. Con ello tenemos más opciones de conseguir la gestación. Si no conseguimos la gestación, es útil conservar ovocitos o embriones para segundos o terceros intentos y así evitar tener que volver a estimular hormonalmente a la mujer y volverla a hacer pasar por una punción folicular. En muchos casos conseguimos la gestación en los primeros intentos y sobran ovocitos o embriones que pueden guardarse para segundas gestaciones.

Para decidir si congelar ovocitos o embriones tenemos que tener en cuenta la siguiente tabla:

Ventajas de la Congelación de embriones

- Técnica con mayor experiencia y disponible en mayor número de centros
- Embriones ya formados, no es necesario fecundarlos después de la descongelación

Inconvenientes de la Congelación de embriones

- Necesidad de pareja masculina. Si la pareja se separa durante el proceso hay problemas
- Mayor protección legal, problemas para cese conservación

Ventajas de la Congelación de ovocitos

- No es necesario pareja masculina. La propietaria es la mujer
- No problemas para cese conservación

Inconvenientes de la Congelación de ovocitos

- Técnica con menor experiencia
- Hay que fecundarlos después de descongelarlos. Se suelen fecundar alrededor de un 70% de los óvulos congelados

En último caso, la decisión de congelar ovocitos o embriones deberá ser tomada teniendo en cuenta la opinión de la mujer y la experiencia de cada centro en cada una de las técnicas

Para la criopreservación de embriones o de óvulos maduros (ovocitos) necesitamos estimular los ovarios para producir un número mayor de óvulos y tener mayor posibilidades de conseguir una posterior gestación.

Actualmente existen dos técnicas utilizadas en los laboratorios para criopreservar ovocitos y embriones, la llamada congelación lenta y la vitrificación. Tanto si es para congelar ovocitos como para congelar embriones, necesitamos realizar un tratamiento hormonal encaminado a obtener una respuesta multi-folicular y una posterior punción-aspiración del contenido folicular de los ovarios para recuperar los óvulos maduros. Este proceso está estandarizado en las clínicas de reproducción asistida y existen diferentes protocolos de estimulación ovárica según las características clínicas de la mujer (edad, antecedentes, índice de masa corporal, etc...). Podemos distinguir tres fases en el proceso: estimulación, extracción, identificación y criopreservación.

1) Estimulación de la maduración de los óvulos en los ovarios mediante la administración diaria de hormonas. La mujer se las puede autoinyectar por vía subcutánea. El tiempo preciso es variable y suele oscilar entre 10-12 días. Durante ese periodo se hacen controles con ecografías por vía vaginal y análisis de hormona (estradiol) en sangre. Estos datos permiten conocer cómo están respondiendo los ovarios al tratamiento y determinar el día correcto de la extracción de los óvulos.

2) Extracción de los óvulos de los ovarios. Se hace mediante punción y aspiración de los folículos ováricos (que es donde están los óvulos). Para ello se introduce una aguja a través de vagina hasta el folículo ovárico que se va a puncionar. Todo se hace bajo control visual ecográfico y previa sedación con anestesia. No es preciso intubación traqueal. La mujer está dormida durante 5-20 minutos y no ha de ingresar en el hospital. Todo el proceso es ambulatorio. En una mujer menor de 35 años se suelen extraer una media de entre 10-12 óvulos. Esta cifra de óvulos obtenidos y la calidad de los mismos es muy dependiente de la edad. A los 35 comienza a disminuir drásticamente el

número y la calidad de los óvulos recuperados de tal forma que entre los 41-42 años las posibilidades de conseguir óvulos válidos son cercanas al 0% (Broekmans et al. 2009).

3) Identificación de los óvulos. Los líquidos foliculares extraídos se observan al microscopio, en el laboratorio contiguo a la sala de punciones, para identificar los óvulos y conocer su estado madurativo.

4) Criopreservación de los óvulos o de los embriones. Una vez identificado los óvulos, se procede a la preservación de los mismos en nitrógeno líquido. En el caso de los embriones, se fecundan y luego se congelan.

Preservación de ovocitos

Los ovocitos son más difíciles de congelar que los embriones. Los ovocitos tienen mayor contenido acuoso y una relación tamaño/superficie mayor que los embriones. Es por ello que las técnicas de congelación de embriones se llevan aplicando desde mediados de los años 80 y la de ovocitos se lleva aplicando sólo en los últimos 5 años.

Congelación lenta

Es una técnica que consiste en evitar que se formen cristales de hielo en el interior del ovocito. Para ello, se usan unos medios crioprotectores que se incorporan al interior del ovocito y mediante una reducción lenta de la temperatura se consigue criopreservar el ovocito sin dañarlo, sin formar cristales de hielo que desgarran las estructuras celulares. Las fases del procedimiento son: 1) Exposición preliminar al crioprotector, a los fines de reducir los daños de cristalización de las células. 2) Reducción progresiva de la temperatura hasta los -196° . 3) Almacenamiento de los óvulos congelados. 4) Descongelamiento de los mismos. 5) Diluir y lavar el crioprotector a los fines de restituir las microcondiciones fisiológicas adecuadas y permitir así al ovocito poder ser fecundado mediante microinyección espermática.

La técnica de congelación lenta se lleva empleando en embriones humanos desde hace más de 25 años^(1,2). Pero no había mostrado su efectividad en

ovocitos hasta una modificación en la concentración de los crioprotectores introducida en el 2001⁽³⁾. En la actualidad es una técnica en desuso porque la vitrificación ha mostrado ser una técnica más rápida y más eficaz para criopreservar tanto embriones como ovocitos^(4,5,6)

Vitrificación

La vitrificación consiste en pasar de la fase líquida a la fase sólida sin pasar por la fase de cristalización. Con esta técnica se consigue evitar la formación de cristales en el interior del ovocito. Requiere la utilización de dispositivos especiales para reducir al mínimo el volumen de medio de cultivo que acompaña al ovocito y de esta manera conseguir unas velocidades muy rápidas enfriamiento. A partir del 2005, se ha generalizado el uso de esta técnica para criopreservar ovocitos⁽⁷⁾. La vitrificación de ovocitos como técnica para preservar la fertilidad femenina ha mostrado su utilidad indiscutible cuando hablamos de vitrificar óvulos maduros en pacientes jóvenes. Es por tanto la edad de la mujer uno de los factores que limita esta técnica. La técnica de vitrificación de ovocitos permite poder realizar unos intentos reproductivos en diferentes ciclos ovulatorios pero no es en ninguna manera comparable a la recuperación de la fertilidad natural. El número de ovocitos congelados es limitado y por lo tanto son limitados los intentos que se pueden hacer⁽⁸⁾

El seguimiento obstétrico y perinatal de los niños concebidos con la técnica de vitrificación de ovocitos no ha mostrado alteraciones. Por tanto, a pesar de ser una técnica relativamente reciente, a la espera de estudios más amplios, puede ser considerada por ahora inócua⁽⁹⁾

Preservación de embriones

Congelación lenta

La crioconservación lenta de embriones entró a formar parte de la práctica rutinaria de la fecundación in vitro a partir de 1983, cuando A. Trounson y L. Mohr⁽¹⁾ hicieran saber del primer embarazo obtenido con un embrión

previamente congelado. Posteriormente la técnica fue perfeccionada por Lasalle en 1985⁽¹⁰⁾. Las fases del procedimiento son las mismas que para la congelación lenta de ovocitos. En la actualidad, los embriones son congelados en las etapas iniciales de su clivaje: pronúcleos o embriones en día 2 de desarrollo, usando variantes de los métodos descritos por Lasalle, que utilizan propanodiol y sacarosa como crioprotectores. Durante el proceso de criopreservación, todas las reacciones químicas dentro de la célula deben suspenderse. Los embriones humanos son almacenados en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C; a esta temperatura el único daño que puede producirse es por radiación ionizante y para que esto ocurra deben pasar cientos de años⁽¹¹⁾. El daño que ocurre con la criopreservación no es por el almacenamiento de los embriones, sino por la formación de cristales dentro de la célula durante el proceso de congelación y descongelación de los embriones. Los protocolos lentos reducen la velocidad a la que se pierde el agua celular, con el consecuente aumento en la concentración de sales que resultan de la formación de cristales de hielo en el medio adjunto. Las tasas de supervivencia embrionaria con la congelación lenta varían entre el 60 y el 80% según el centro.

Vitrificación

La vitrificación como técnica para preservar embriones humano fue introducida en 1998 por Mukaida⁽¹²⁾. En un principio esta técnica no se extendió por la necesidad de tener que usar unas altas concentraciones de crioprotectores potencialmente tóxicas. La realidad ha demostrado que se obtienen mejores tasas de embarazo y de nacimiento de niño con la vitrificación y esto ha desplazado la utilización de la congelación lenta⁽⁶⁾. La vitrificación ha permitido también preservar con éxito embriones en el estado de blastocisto⁽¹³⁾, estado en el que la congelación lenta no había nunca obtenido buenos resultados. Las tasas de supervivencias descritas con la vitrificación de embriones son superiores al 90%.

1- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983 Oct 20-26;305(5936):707-9.

2- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1986 Apr 19;1(8486):884-6.

3- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod*. 2001 Mar;16(3):411-6.

4- Boldt J. Current results with slow freezing and vitrification of the human oocyte. *Reprod Biomed Online*. 2011 Sep;23(3):314-22.

5- Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, Alegretti JR, Motta EL. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril*. 2010 Nov;94(6):2088-95.

6- AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2010 Feb;20(2):209-22.

7- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2005 Sep;11(3):300-8.

8- Dondorp WJ, De Wert GM Fertility preservation for healthy women: ethical aspects. *Hum Reprod*. 2009 Aug;24(8):1779-85

9- Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, Ruvalcaba Castellón LA, García Amador MI, Montoya Sarmiento JE. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008 May;16(5):608-10.

10- Lasalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril*

1985;44:645-651

11. Whittingham DG. Principles of embryo cryopreservation In: Ashwood Smith MJ, Farrant J. eds. Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Tunbridge Wells: Pitman Medical, 1980:65-84.

12- Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. Hum Reprod. 1998 Oct;13(10):2874-9.

13- Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update. Reprod Biomed Online. 2009;19 Suppl 4:4328.