

CRIOBIOLOGÍA DE GAMETOS

Claudio Bisioli

*Germinal - Consultorías Expertas en Reproducción Asistida
Griveo 2474 (C1419EVF) Ciudad Autónoma de Buenos Aires
(011) 4 571 5326
bisioli@fibertel.com.ar*

Introducción

Criopreservar gametos y embriones nos permite almacenar material genético en un rango de usos muy variados, desde las necesidades de preservación de la fertilidad de los pacientes con cáncer, hasta la reproducción de especies de interés agropecuario o la preservación de genomas en las especies animales y vegetales amenazadas de extinción. En fertilidad asistida humana permite manejar el tiempo de ocurrencia de los eventos (*timing*) de la fecundación y las transferencias. La criopreservación de espermatozoides está estandarizada, pero la de ovocitos permanece aún en su fase experimental. Su desarrollo significaría un importante impacto clínico ya que:

- permitiría la preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas o en aquellas mujeres sin pareja,
- reduciría o eliminaría la necesidad de utilizar drogas de hiperestimulación ovárica,
- evitaría entonces el síndrome de hiperestimulación ovárica,
- sería una opción terapéutica para las pacientes anovuladoras,
- permitiría estudiar el estatus de salud de las donantes de ovocitos seis meses después de la donación (como se hace actualmente con los donantes masculinos).

Teoría criobiológica

En 1866 Mantegazza observó que los espermatozoides sobrevivían el enfriamiento a -17°C . Pero no fue hasta 1949 (83 años después) en que Polge, Smith y Parkes descubrieron los efectos crioprotectores del glicerol sobre los espermatozoides y otras células de varias especies ⁽¹⁾. Esto abrió el campo a una serie de descubrimientos subsecuentes que formaron la base de la actual teoría criobiológica.

En síntesis, criopreservar una célula cualquiera consiste en exponerla primero a una solución salina hipertónica simple que contiene una sustancia "crioprotectora" permeable (por ejemplo, el mencionado glicerol) y una no permeable (la

sacarosa, por ejemplo). Esta exposición breve va a hacer que la célula se deshidrate y que el agua intercelular sea reemplazada por la sustancia crioprotectora permeable. O sea que voy a tener una célula X llena de glicerol en lugar de agua. Luego la célula será enfriada en una máquina hasta -7°C (entre -6°C y -9°C según cada protocolo y el material que se desee congelar). En este punto el contenido será enfriado abruptamente (tocando el recipiente con un hisopo o una pinza enfriada previamente en nitrógeno líquido) y se disparará la formación de hielo en la solución extracelular. Esto evitará el súper-enfriado de esa solución (su punto de congelamiento está por debajo de -7°C) que es dañino para las células. A partir de allí se iniciará un descenso lento hasta por debajo de -30°C donde irá aumentando paulatinamente la tonicidad de la solución (es decir, se hará cada vez más hipertónica porque habrá cada vez más hielo y la sal se irá concentrando en el crioprotector remanente aún en estado líquido, lo que deshidratará aún más a la célula). Luego de -30°C se podrá sumergir directamente en nitrógeno líquido (-196°C) para ser almacenada casi, en términos prácticos, indefinidamente. Esta temperatura vitrificará la pequeña cantidad de agua remanente, evitando la formación de los peligrosos cristales de hielo.

El hielo tiene otra oportunidad de formarse: cuando se quiera descongelar el material. Para evitarlo habrá que, a la inversa del congelamiento, hacerlo lo más rápido posible para no dar lugar a que el agua vitrificada que se está licuando se convierta en cristales de hielo. Luego habrá que rehidratar el material pasándolo por sucesivas soluciones cada vez más isotónicas.

Durante estos dos procesos, el enfriamiento y la descongelación, las células son expuestas a un número de factores estresantes que pueden infligir diferentes grados de daño, a saber:

- la toxicidad de los medios o agentes crioprotectores,
- las modificaciones osmóticas,
- el efecto del enfriamiento.

Identificar estos y otros factores y asignarles una importancia relativa es una de las metas de la moderna criobiología. El propósito de este artículo es revisar los conceptos de la criobiología de ovocitos y espermatozoides humanos para su uso en reproducción y conservación de la fertilidad. Las opciones de criopreservación son las siguientes:

- Ovocitos inmaduros y preovulatorios,
- tejido ovárico,
- folículos primordiales y pre-antrales,
- semen,
- células madre espermatogoniales.

Se mencionarán brevemente algunos aspectos de la congelación de tejido, folículos y células madre, ya que el presente artículo está enfocado preferentemente a los aspectos de la criobiología de ovocitos y espermatozoides como células individuales.

Ovocitos

Podríamos decir que los ovocitos de mamíferos son células muy grandes, que están llenas de reservas y que, a diferencia de los gametos

masculinos, no poseen movimiento propio. También podríamos definirlos como esferoides cuya relación superficie/volumen es muy baja (la esfera es el cuerpo de mayor volumen y menor superficie). Esto hace que para congelarlos sea necesario enfriarlos y deshidratarlos lentamente para dar tiempo a que salga la suficiente cantidad de agua como para evitar la formación intracelular de hielo y la consiguiente injuria (denominada "criodaño": es decir, la destrucción de estructuras celulares debido a la acción de los cristales de hielo ⁽²⁾). Por el contrario, se necesita un protocolo de descongelación rápida para no dar tiempo a la recristalización durante la rehidratación.

En 1986 Chen reportó el primer embarazo originado a partir de un ovocito humano criopreservado ⁽³⁾. A partir de allí se han reportado numerosos nacimientos originados de esta manera, resumidos en la siguiente tabla ⁽⁴⁾:

Una revisión de estos resultados nos muestra que, a pesar de que se han reportado valores aceptables de sobrevida, fecundación y desarrollo

Tabla I: Resultados de criopreservación de ovocitos humanos reportados en la literatura (hasta 2003).

Estudio	Método	Fertilización	Ovocitos (n)	Embarazos	Nacidos
Chen, 1986 (3)	enfriado lento	FIV	40		1
Van Uem et al., 1987 (5)	enfriado lento	FIV	28		1
Al-Hasani et al., 1987 (6)	enfriado lento y rápido	FIV	182		2
Siebzehnrübl et al., 1986 (7)	enfriado lento	FIV	38		1
Tucker et al., 1996 (8)	enfriado lento, PG+S	ICSI	81	3	0
Porcu et al., 1997 (9)	enfriado lento, PG+S	ICSI	12	1	1
Tucker et al., 1998 (10)	enfriado lento, PG+S	ICSI	13	1	1
Borini et al., 1998 (11)	enfriado lento, PG+S	ICSI	129	3	-
Porcu et al., 1998 (12)	enfriado lento, PG+S	ICSI	709	9	6
Young et al., 1998 (13)	enfriado lento, PG+S	ICSI	9	1	(3)
Polak de Fried et al., 1998 (14)	enfriado lento, PG+S	ICSI	10	1	1
Kuleshova et al., 1999 (15)	vitricación, EG+S	ICSI	17	1	1
Kuwayama and Kato, 2000 (16)	vitricación, EG+S	ICSI	?	1	1
Donaldson et al., 2000 (17)	enfriado lento, PG+S	ICSI	18	2	-
Yoon et al., 2000 (18)	vitricación, EG+S	CSI	90	3	2
Porcu et al., 2000 (19)	enfriado lento, PG+S	ICSI	1840	19	12
Winslow et al., 2001 (20)	enfriado lento, PG+S	ICSI	324	-	16
Wu et al., 2001 (21)	vitricación, EG+S	FIV		1	-
Chen et al., 2002 (22)	enfriado lento, PG+S	ICSI	8	1	-
Porcu et al., 2002 (23)	enfriado lento, PG+S	ICSI	124	-	3
Yang et al., 2002 (24)	enfriado lento, PG+S	ICSI	158	11	14
Quintans et al., 2002 (25)	enfriado lento, PG+S	ICSI	109	5	2
Katayama et al., 2003 (26)	vitricación, EG+S	ICSI	46	2	-
Yoon et al., 2003 (27)	vitricación, EG+S	ICSI	474	-	7
Fosas et al., 2003 (28)	enfriado lento, PG+S	ICSI	88	-	5
Boldt et al., 2003 (29)	enfriado lento, PG+S	ICSI	90	-	5

PG: propilen glicol; S: sacarosa; EG: etilen glicol.

embrionario, el número de niños nacidos por número de ovocitos congelados es raramente superior al uno por ciento. Esto nos demuestra que simplemente adecuar protocolos de criopreservación de embriones (con los que se logran resultados muy aceptables con protocolos ya estandarizados) a la congelación de ovocitos no funciona del todo bien.

Es evidente que el equipo de Eleonora Porcu lleva la delantera en cuanto a número y resultados. En 2003 presentó su experiencia⁽³⁰⁾ en una Sesión Plenaria del congreso anual de la Sociedad Estadounidense de Reproducción Humana. Su casuística en ese momento incluía a pacientes menores de 38 años que padecían sólo infertilidad tubaria, con factor masculino normal, sin fracasos previos de fecundación *in vitro*, y con al menos 10 ovocitos de buena calidad recuperados durante un procedimiento de hiperestimulación ovárica controlada y punción folicular. Luego de 300 transferencias de embriones producidos a partir de la congelación-descongelación de estos ovocitos (mediante un protocolo lento con propileno glicol y sacarosa como agentes crioprotectores), estos autores obtuvieron una tasa de embarazo del 19 % con una implantación del 8 % y abortos del 25 %, cifras nada desdeñables pero muy alejadas de lo que se consigue con un grupo así seleccionado de pacientes mediante técnicas convencionales de fecundación *in vitro*.

Han aparecido además reportes ocasionales indicando que la congelación de ovocitos podría inducir efectos mutagénicos en los embriones resultantes^(31, 32). Hace varios años un famoso estudio sugirió también que la congelación de embriones podía “no ser completamente neutral”, y que las consecuencias potenciales a largo plazo “justificaban un uso más limitado de esta técnica en la práctica clínica”⁽³³⁾. Un análisis reciente de niños nacidos a partir de embriones criopreservados, ha concluido que los datos disponibles indican que la criopreservación no tiene efectos negativos sobre el desarrollo perinatal y temprano de los infantes⁽³⁴⁾.

Las razones por las cuales los ovocitos son más difíciles de congelar que los embriones son aún inciertas. Evidentemente en las diferencias entre ambos tipos de células está la clave. La más obvia es la referida al estatus genético: en ovocitos maduros el ADN está compactado en forma de cromosomas alineados en la placa metafásica, mientras que la mayoría del ADN en un embrión existe como cromatina descondensada en interfase. Es lógico suponer entonces que el estado físico del ADN tiene su efecto sobre el éxito de la criopreservación.

La fecundación de los ovocitos criopreservados y el desarrollo embrionario posterior pueden verse afectados después del proceso de criopreservación debido a numerosas razones que trataré de resumir a continuación^(35, 36):

Ovocitos maduros (metafase II)

- El problema número uno es el del desmontaje irreversible del huso meiótico durante el enfriamiento: los ovocitos maduros están bloqueados en Metafase II (segundo bloqueo meiótico) donde los cromosomas están unidos a los microtúbulos del huso meiótico. Este estadio es muy sensible al enfriamiento debido a que los microtúbulos pueden ser despolimerizados^(37, 38). Esto puede conducir a un aumento de la poliploidía y aneuploidía cuando los ovocitos descongelados son fecundados. Pickering y sus colegas⁽³⁷⁾ encontraron que enfriar ovocitos humanos a temperatura ambiente durante tan breve tiempo como 10 minutos causaba daños irreversibles al huso meiótico. Porcu⁽²⁾, siguiendo los resultados de Gook *et al.*⁽³⁹⁾, ha argumentado que la pérdida de cromosomas luego de congelar y descongelar ovocitos no sería tan importante como se pensó en un principio. Este argumento parece ser más una respuesta a la crítica contra la falta de estudios de diagnóstico genético preimplantación en los embriones generados a partir de ovocitos congelados, que un argumento científico bien fundamentado. Curiosamente, Songsassen *et al.*⁽³⁸⁾ encontraron que había diferencias significativas en la sensibilidad de los ovocitos al enfriamiento según provinieran de diferentes hembras de monos Rhesus. Si esto es verdad también para humanos, podría explicarse entonces, en parte, por qué ha sido tan difícil obtener niveles altos de sobrevida con ovocitos congelados de una manera reproducible.
- También los componentes del cito-esqueleto se pueden despolimerizar y conducir a una alteración en la forma y los movimientos de las organelas y proteínas dentro de las células⁽⁴⁰⁾.
- La exocitosis espontánea de los gránulos corticales conduce a la reacción prematura de la zona pelúcida, impidiendo la entrada de espermatozoides.
- Fecundación reducida debido a los efectos de los medios crioprotectores (que aumentan su toxicidad con el tiempo de exposición y la temperatura), y el enfriamiento sobre la zona pelúcida (produciendo el endurecimiento o la rotura de la zona).
- Activación partenogenética debido al choque (*shock*) térmico o a la acción de los crioprotectores⁽⁴¹⁾.
- Choque osmótico durante la deshidratación y rehidratación.

- Daño a la membrana celular.
- Diginia producto de la retención del segundo cuerpo polar luego de la fecundación.

Ovocitos inmaduros (profase I)

La criopreservación de ovocitos en Profase I se ha propuesto como una alternativa para evitar los problemas de trabajar con ovocitos MII. En el estadio de dictiotene durante la Profase I los cromosomas están ordenados de una forma muy distinta, las células son más pequeñas e indiferenciadas y carecen de una zona pelúcida bien desarrollada (2,36). Pero después de descongelar esta material enfrentaremos aún la barrera de la maduración de estos ovocitos tempranos. Los resultados actuales no han alentado mayor investigación en este sentido.

Tejido ovárico, folículos primordiales y pre-antrales

La idea de criopreservar tejido ovárico o folículos aislados en lugar de ovocitos inmaduros u ovulados tiene ciertas ventajas para las pacientes oncológicas:

- No se necesita hiperestimular el ovario y por lo tanto no hay riesgo para las pacientes con cánceres estrógeno-dependientes.
- Puede ser usada tanto en niñas como en mujeres adultas.
- Los folículos primordiales:
 - sufren menor criodaño debido a que:
 - poseen un metabolismo relativamente inactivo,
 - no tienen zona pelúcida, huso o gránulos corticales,
 - son más pequeños y menos diferenciados,
 - tienen más tiempo para restaurar el criodaño.
 - Son más abundantes y fáciles de obtener.
 - Con tejido ovárico se podría restaurar la fertilidad mediante trasplante, sin necesidad de maduración in vitro.

La desventaja más importante de este abordaje es que la técnica es aún experimental y que existe cierto riesgo de reintroducción de células cancerígenas.

Maneras diferentes de abordar el desafío de congelar ovocitos

Lo que resulta evidente, entonces, volviendo al tema de la congelación de ovocitos inmaduros u ovulados, es que es necesario un acercamiento radicalmente diferente a este problema si se

quiere tener éxito en su congelación y descongelación. Para Stachecki (42) el problema reside en que estamos tratando con un número de condiciones desconocidas. Según este autor, cuando una célula se lisa por el daño inflingido por la congelación, el razonamiento típico es que la célula ha muerto debido a los dos chivos expiatorios de este asunto: la formación intracelular de hielo o el estrés osmótico. Pero si es así, ¿por qué no mueren todas las células? Stachecki *et al.* (43) desestimaron la importancia de estos dos factores y enfocaron su atención en otros, en especial a la composición de los medios en los que los ovocitos son congelados, descubriendo que el reemplazo de todos los iones sodio por iones de colina permitían congelar ovocitos más efectivamente, teniendo un efecto dramático sobre su supervivencia. Este método ha sido utilizado exitosamente en nuestro país para criopreservar ovocitos humanos y ha resultado en el nacimiento de niños sanos (25).

Más tarde Stachecki y Willadsen (44) exploraron los efectos de la temperatura de inmersión en nitrógeno líquido (grado de deshidratación) y los regímenes de descongelación sobre la supervivencia de ovocitos de ratón. En estudios subsecuentes estos autores han demostrado que los factores clave que deben ser orquestados para maximizar la supervivencia de los ovocitos criopreservados son los siguientes:

- La composición del medio de criopreservación.
- El método y la extensión de la deshidratación.
- El tiempo de equilibrio con el crioprotector.
- La temperatura de inmersión.
- El régimen de descongelación.

Ajustando estos factores consiguieron criopreservar ovocitos de ratón con una sobrevivencia del 95 % y una tasa de formación de blastocistos del 75 % (42). Esto representa una mejora muy significativa comparada con lo publicado hasta ese entonces. Haciendo foco en estos problemas en lugar de los clásicos de la formación de hielo y los “efectos osmóticos”, fueron capaces de identificar áreas problemáticas y modificar protocolos. Trabajando con ovocitos humanos aprendieron que una concentración más alta de sacarosa y un tiempo de equilibrio más prolongado eran beneficiosos para la supervivencia ovocitaria, un hallazgo similar al de Fabbri *et al.* (45).

En 1985 Rall y Fahy (46) describieron el método de la vitrificación como una potencial alternativa a los protocolos de descenso lento de la temperatura. Aunque el método tuvo cierto éxito

relativo para el almacenamiento de embriones, no ha sido muy reproducible para trabajar con ovocitos. La vitrificación involucra la exposición de las células a altas concentraciones de medio crioprotector por breves períodos a temperatura ambiente, seguido de la inmersión inmediata en nitrógeno líquido. La alta osmolaridad del crioprotector deshidrata rápidamente a la célula y la inmersión en nitrógeno líquido la solidifica tan rápidamente que no permite que se formen cristales de hielo con el agua remanente. Con los protocolos de descenso lento ocurre algo similar pero en la fase final y a más bajas temperaturas. La vitrificación entraña riesgos mayores para la célula que los protocolos de descenso lento, debido a la toxicidad de los crioprotectores de alta concentración y la temperatura a la que son usados (ambiente). Kuleshova *et al.* (15) reportaron el nacimiento de una niña sana usando éste método, y Vajta *et al.* (47) lo adaptaron para su uso con ovocitos bovinos inventando las pajuelas abiertas y estiradas (*open-pulled straws*), que son alargadas con el propósito de reducir su diámetro y permitir un tiempo de vitrificación aún más rápido. Éste es un método útil para aquellas especies que exhiben alta sensibilidad a la reducción de la temperatura, como ocurre en vacunos y porcinos. Los criobiólogos han diseñado otros aparatos con el fin de optimizar la reducción del tiempo de vitrificación:

- *cryoloop*: un lazo de nylon muy pequeño que se usa para sostener a los ovocitos en una fina película de agente crioprotector antes de sumergirlo directamente en nitrógeno líquido (48),
- *cryotops* (16): platillos de criopreservación de volumen mínimo.
- rejas de cobre de microscopía electrónica (49),
- pipetas de desnudación de ovocitos,
- hemi-pajuelas,
- malla de nylon,
- microgotas.

Otro abordaje ha tratado de modificar los mismos ovocitos inyectando trehalosa como medio crioprotector directamente dentro de los ovocitos, antes de iniciar el descenso de temperatura en una solución también compuesta por trehalosa (50). El motivo de la inyección es que los ovocitos son impermeables a la trehalosa.

En humanos se necesita aún más investigación para saber cuál va a ser el método más favorable para la congelación y almacenamiento de ovocitos. Así lo entiende la Sociedad Estadounidense de Medicina Reproductiva. El Dr. Marc Fritz (Profesor de Obstetricia y Ginecología y Jefe de la

División de Endocrinología Reproductiva e Infertilidad en la Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, Estados Unidos) expresó ante la prensa durante el Congreso de dicha Sociedad en Philadelphia (16-20 de Octubre de 2004) la posición oficial del Comité de Prácticas de dicha sociedad con respecto a la criopreservación de tejido ovárico y ovocitos humanos, publicada en el número de Octubre de 2004 de la revista *Fertility and Sterility* (51). Aunque la criopreservación de ovocitos y tejido ovárico son técnicas promisorias, el Dr. Fritz ha remarcado que “el punto de vista de la Sociedad es que esta tecnología no está todavía lista para ser considerada un servicio clínico establecido”. El siguiente es un resumen de la opinión de dicho comité:

En artículos periodísticos recientes, aquéllos que comercializan este servicio, pretenden que la criopreservación de ovocitos pueda ofrecer a una mujer que congela sus ovocitos siendo joven un 20 % de chance de embarazo luego de descongelarlos, fecundarlos *in vitro* y transferirlos al útero. Una de las compañías que publicitan el servicio en internet se jacta de poseer una tasa de éxito superior al 35 %. Estas pretensiones son un “extrapolación optimista de una experiencia mundial limitada”. La literatura científica mundial “documenta actualmente alrededor de 100 nacimientos a partir de ovocitos criopreservados, y ésta difícilmente constituya una experiencia suficiente sobre la cual basar una extrapolación certera de lo que puede ofrecer este tratamiento aplicado más ampliamente”. El reporte del Comité diferencia entre mujeres que están siendo tratadas por cáncer, las cuales virtualmente no tienen otras opciones para preservar su fertilidad, de aquellas mujeres jóvenes y sanas que desean usar la tecnología de la criopreservación como un medio para diferir la ocurrencia de embarazo.

En resumen, el reporte del Comité concluye que:

1. Las quimio y radioterapias plantean riesgos significativos a la fertilidad femenina futura.
2. Generalmente, para las mujeres que enfrentan un futuro tratamiento oncológico, no hay tiempo suficiente para permitir una estimulación ovárica, captación de ovocitos y criopreservación de embriones.
3. La criopreservación de tejido ovárico y de ovocitos son técnicas promisorias para la preservación de la fertilidad.
4. La función ovárica ha sido documentada en un pequeño número de casos luego de trasplante ortotópico (pélvico) y heterotópico (antebrazo, abdomen) de tiras de corteza ovárica descongeladas.
5. La criopreservación de tejido ovárico y los trasplantes deberían ser considerados como técnicas

experimentales que sólo deben llevarse a cabo bajo la supervisión de comités de ética institucionales.

6. Las recientes modificaciones en los protocolos de laboratorio han resultado en un incremento de la sobrevida, la fecundación y las tasas de embarazo a partir de ovocitos criopreservados y descongelados para fecundación *in vitro*.

7. No se ha observado en los niños nacidos a partir de ovocitos criopreservados un incremento en las anormalidades cromosómicas, los defectos de nacimiento o las deficiencias en el desarrollo, aunque estas observaciones están basadas en un número limitado de embarazos y nacimientos.

8. La criopreservación de ovocitos debería ser considerada una técnica experimental, que sólo debe ser llevada a cabo como procedimiento experimental bajo la supervisión de comités de ética institucionales.

9. Ni la criopreservación de tejido ovárico ni la de ovocitos deberían ser comercializadas ni ofrecidas como medios para postergar la edad reproductiva.

Espermatozoides

En el polo opuesto en cuanto a dificultades en el proceso de criopreservación se encuentran los espermatozoides, que parecen ser células ideales para criopreservar: una muy pequeña masa con poca agua y mucha membrana (o en otras palabras, una relación superficie/volumen muy alta) por donde permitir el paso del agua y las sustancias crioprotectoras y evitar la formación intracelular de hielo, el criodañó y la recristalización durante el descongelación (2).

Hay otras razones por las cuales es más sencillo congelar espermatozoides que ovocitos:

1. Siempre tenemos muchos más espermatozoides que ovocitos. Aún en los casos más severos de infertilidad masculina podemos contar con una incomparable cantidad de espermatozoides supervivientes para ser utilizados. Sin embargo, en aquellos casos muy severos la dificultad va a residir en saber encontrar a los escasos supervivientes luego de la descongelación.

2. Los espermatozoides son solo vectores de la información genética masculina. Casi no hay aporte de organelas masculinas al nuevo individuo (con excepción de los centríolos), y por lo tanto no hay riesgo debido al daño intracelular. Los espermatozoides carecen de gránulos corticales o zona pelúcida: son estructuras biológicas más simples con menores requerimientos durante la criopreservación. Sin embargo, la fecundación puede verse perjudicada después de la descongelación.

3. La diferencia entre superficie y volumen se hace más dramática aún cuando se trata de objetos de muy diferente tamaño, como en el caso de espermatozoides (5 micrones mide el eje menor de su cabeza con forma de elipsoide) y ovocitos (120 micrones de diámetro, o sea, veinticuatro veces más grande que un espermatozoide). Para entender esto, usemos el ejemplo utilizado por Dawkins (52). Supongamos que un fabricante de cajas de fósforos, con propósitos de propaganda, construye una de 2 metros de altura. Una caja estándar mide 2 cm de altura, es decir, que en un sentido la caja estándar es 100 veces más pequeña. Para llenar la caja gigante con cajitas estándares necesitaríamos una cantidad de cajitas igual a $100 \times 100 \times 100$, es decir, no cien sino un millón de cajitas. Entonces, en otro sentido, la caja a escala gigante es un millón de veces más grande que la cajita de bolsillo. Más aún, si cortamos y plegamos una de las cajitas y metemos el cartoncito plegado dentro de otra cajita, la vamos a llenar completamente. Pero si lo hacemos con una gigante, el cartón plegado va a apenas notarse en el fondo de otra caja gigante. La moraleja de la historia es que la razón superficie/volumen es mayor para objetos pequeños que para grandes. Los objetos (o en este caso, las células) más pequeños son más “superficiosos” que los objetos grandes.

4. Un último problema que puede mencionarse es el de la rotura potencial de ADN causada por la acción de la radiación cósmica. Se ha calculado que este efecto podría evidenciarse luego de un tiempo de almacenamiento mayor a 300 años para los ovocitos y de alrededor de 2000 años para los espermatozoides. Los cromosomas de los espermatozoides están ensamblados de manera diferente: no están unidos al uso meiótico sino que el ADN espermático está empaquetado mediante protaminas y súper-enrollado en estructuras llamadas “lazos toroidales” (*toroidal loops*). Este arreglo tan cerrado (una especie de bobinado o toroide alrededor de las histonas) le permite a los espermatozoides sobrevivir mejor a las potenciales averías que pudiera sufrir el ADN causadas por efecto de la radiación cósmica (ver “El Paso del Tiempo”).

Desde el punto de vista operativo contamos aún con más ventajas cuando trabajamos con espermatozoides (!):

- El procedimiento es sencillo y de bajo costo.
- Se pueden congelar con éxito muestras de buena y mala calidad. Aún con muestras de TESE (del inglés, *testicular sperm extraction*) se obtienen excelentes resultados.

- No hay evidencia de daños genéticos o epigenéticos a causa de la congelación.
- No hay evidencia de asociación con embarazos anormales.
- No hay asociación con malformaciones.

Sin embargo, no se pueden descartar daños menores al material genético (mutaciones) hasta que no contemos con métodos de revisión o *screening* de genoma completo. Se recomienda entonces el seguimiento a largo plazo de los nacidos mediante estas técnicas.

A pesar de contar con todas estas ventajas y con 50 años de experiencia en el tema, desde los tempranos trabajos de Polge *et al.* ⁽¹⁾ los criobiólogos, embriólogos clínicos y veterinarios no han podido superar una sobrevida promedio del 50 - 60 %. Sin embargo este es un buen desempeño de las técnicas estándares, congelando muestras normales que no ha estimulado mayor investigación en esta área. Ante el desafío de congelar muestras subóptimas debido a los avances en reproducción asistida (el advenimiento del ICSI, la utilización de biopsias testiculares, etc.), John Morris de la empresa Asymptote Ltd. en Cambridge, Reino Unido, propuso en 1998 reemplazar las curvas tradicionales de criopreservación (de descenso lineal) por otras curvas que respetasen la manera en que la mayoría de los parámetros físicos varían con la temperatura, es decir, en forma no-lineal ⁽⁵³⁾, obteniendo valores de sobrevida del 88 % que, sin embargo, no han sido luego reproducidos a nivel mundial.

Finalmente mencionaré que, de todas las ventajas reseñadas para la congelación de semen, ninguna se aplica cuando estamos tratando con pacientes oncológicos pre-púberes. Para estos difíciles casos contamos con dos estrategias quirúrgicas aún experimentales ⁽⁵⁴⁾:

- La primera estrategia consiste en fomentar la actividad de las células madre espermatogoniales que han sobrevivido a los tratamientos anticancerígenos. En este caso, la manipulación farmacológica de los niveles hormonales post tratamiento estimulan la recuperación funcional del ambiente somático y de la actividad de las células madre sobrevivientes, para reiniciar su función dual (auto-renovación y diferenciación) y mantener la espermatogénesis.
- La segunda estrategia consiste en manipular quirúrgicamente las células madre en tres pasos:
 - extraer biopsias de testículo y células madre antes de la terapia oncológica.
 - criopreservar las células madre.

- transferirlas en forma autóloga al paciente después de la terapia. Esta estrategia puede dividirse además en dos abordajes:

- trasplante de células madre espermatogoniales, donde una suspensión de células individuales son inyectadas dentro de los túbulos seminíferos, o
- implante de biopsias testiculares, donde las muestras enteras son injertadas en los testículos o bajo la piel de los pacientes.

El Paso del Tiempo

Existen algunos reportes anecdóticos que señalan que los ovocitos y embriones humanos pueden deteriorarse durante su almacenamiento a -196°C. Estos supuestos daños se deben seguramente a un mal manejo de las muestras y no a los efectos del paso del tiempo a bajas temperaturas.

En teoría los pre-embriones humanos pueden ser criopreservados indefinidamente, y aunque las tasas de embarazo que se logran transfiriendo pre-embriones criopreservados y descongelados son menores que las que se logran con embriones “frescos” (que no han sido criopreservados), no existe ninguna evidencia significativa de un aumento de problemas congénitos o de desarrollo en los nacidos mediante estas técnicas ⁽⁵⁵⁾.

Existen numerosos estudios que han demostrado que no existen efectos perjudiciales debido al almacenaje a largo plazo de pre-embriones criopreservados humanos ^(56,57). Los embarazos logrados mediante la transferencia de embriones criopreservados-descongelados, han demostrado tener las mismas características –en términos de edad gestacional media, peso al nacer, mortalidad perinatal e incidencia de malformaciones congénitas- que los embarazos logrados a partir de la transferencia de embriones frescos y, más aún, que las concepciones naturales ^(58,59,60). La salud general y el desarrollo de los niños nacidos mediante estas técnicas no parecen estar afectadas por el proceso de criopreservación ^(60, 61). Un estudio reciente de niños nacidos a partir de pre-embriones criopreservados, concluyó que los datos disponibles indican que la criopreservación no tiene efectos negativos sobre la salud perinatal y el desarrollo temprano de los infantes ⁽³⁴⁾.

Se ha estudiado además el efecto de la radiación ionizante de base (o radiación cósmica) que recibe desde el espacio el material criopreservado. Esta radiación ionizante es el único factor conocido que podría afectar la salud de los pre-embriones criopreservados. Para ello se ha simulado, usando embriones de ratón, la radiación cósmica que recibirían durante 2.000 años de almacenaje. No se observó ningún

efecto en la morfología, el desarrollo, la tasa de implantación o la tasa de nacidos vivos ⁽⁶²⁾.

Se han reportado también embarazos obtenidos con embriones criopreservados almacenados durante más de 8 años ^(63,64). Asimismo, embriones de oveja y de ratón han sido exitosamente almacenados durante al menos 13 años ⁽⁶⁵⁾.

Una Cuestión de Seguridad

La última parte de esta actualización está dedicada al ineludible tópico de la seguridad de las muestras que se criopreserven y almacenen, ya que existe evidencia de contaminación viral con cepas de Hepatitis B entre muestras de tejidos criopreservados en nitrógeno líquido ^(66,67,68,69). Aunque no se ha reportado hasta el presente ningún caso de HIV transmitido de esa forma, es imprescindible tomar las precauciones para evitar los riesgos de una potencial contaminación con virus de HIV ^(70,71). Contamos con algunos pasos clave o recomendaciones ⁽⁶⁶⁾ que deben ser considerados para asegurar la seguridad de las muestras almacenadas:

- Investigar a todos los pacientes o donantes para los virus de la inmunodeficiencia humana, de las hepatitis B y C y de la sífilis.
- Usar tanques de cuarentena para mantener las muestras hasta que los resultados de los estudios estén completos, antes de enviar las muestras sanas al sistema de almacenaje general.
- Usar una segunda "protección" (por ejemplo, el producto "Cryoflex" de Nunc Nalge International, Dinamarca) para un sello adecuado a los criotubos.
- Un sellado adecuado es vital. Las pajuelas deben ser selladas mediante calor en ambos extremos.
- Alicuotar el polvo sellador: éste puede acumular microbios luego de su uso prolongado con muestras distintas.
- Descartar las pajuelas con fisuras.
- Esterilizar (e.g., con hipoclorito) las pajuelas después de la descongelación y antes de abrirlas.
- Los tanques de nitrógeno deberían ser limpiados y desinfectados al menos cada año ⁽⁷²⁾.

Haciendo una referencia más general al tema de la seguridad del material almacenado, un programa de criopreservación debería observar las siguientes recomendaciones ⁽⁷²⁾:

- Todos los procedimientos del laboratorio deben incluir el doble control y la provisión de una identificación única para cada paciente a la vez que se garantice la confidencialidad.
- Un protocolo escrito, firmado y fechado para cada procedimiento.
- Mantenimiento regular del equipo.

- Las facilidades de almacenamiento deberían estar adecuadamente controladas y contar con alarmas.

Consideraciones finales

Podemos afirmar entonces que la tarea clínica y/o científica de criopreservar materiales biológicos parece un desafío a menudo desalentador. La congelación de embriones humanos está estandarizada pero las tasas de embarazo no superan, en el mejor de los programas, la mitad de los valores de embarazo que se consiguen con embriones "frescos". Los resultados con ovocitos son muy variables y difíciles de reproducir, considerándose a la técnica aún experimental. Los resultados con blastocistos son igualmente esquivos y la técnica con espermatozoides permanece casi sin variaciones en los últimos 50 años. La preservación de tejido ovárico es también experimental y en todo el mundo se cuenta con apenas un par de embarazos. La puerta está abierta para el ingreso de nuevos paradigmas que renueven los métodos de congelación y descongelación de materiales biológicos.

Referencias

1. Polge C, Smith A, Parkes A . Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;164:6
2. Porcu E. Oocyte cryopreservation. In: *Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory and Clinical Perspectives*. Gardner DK, Weissman A, Howles CM & Shoham Z, Eds. Martin Dunitz, London. 2001
3. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1:884-6
4. Leibo SP. Cryopreservation of mammalian oocytes. In: *Preservation of Fertility*. Tulandi T y Gosden RG, Eds. Taylor & Francis, Londres. 2004
5. Van Uem JFHM, Siebzehrübl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987;1:752-3
6. Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987;2:695-700
7. Siebzehrübl E, Trotnow S, Weigel M, Kniewald T, Habermann PG, Kreuzer E, Hunlich T. Pregnancies after in vitro fertilization, cryopreservation and embryo transfer. *J In Vitro Fertil Embryo Transf* 1986;3:261-3
8. Tucker M, Wright G, Morton P, Shanguo L, Massey J, Kort H. Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using

- 1,2-propanediol and sucrose. *Hum Reprod* 1996;11:1513-5
9. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;68:724-6
 10. Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;70:578-9
 11. Borini A, Bafaro MG, Bonu MA, et al.. Pregnancies after oocyte freezing and thawing. *Human Reprod* 1998;13 (Abstract Book 1):124-5
 12. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, et al.. Birth of six healthy children after intracytoplasmic sperm of cryopreserved human oocytes. *Human Reprod* 1998;13 (Abstract Book):124
 13. Young E, Kenny A, Puigdomenech E, Van Thillo G, Tiveron M, Piazza A. Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved oocytes: case report. *Fertil Steril* 1998;70:360-1
 14. Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M, Marazzi A, Gomez Gonzalez M. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil Steril* 1998;69:555-7
 15. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A.. Birth following vitrification of small number of human oocytes. *Human Reprod* 1999;14:3077-9
 16. Kuwayama M, Kato O. Successful vitrification of human oocytes. *Fertil Steril* 2000;74:549
 17. Donaldson MJ, Quintans CJ, Rocha M et al.. Pregnancies achieved after the transfer of embryos obtained by IVF of human oocytes cryopreserved in low sodium medium: report of two cases. *Hum Reprod* 2000;15 (Abstract Book 1):152
 18. Yoon TK, Chung HM, Lim, Han SY, Ko JJ, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2000;74:180-1
 19. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:33-7
 20. Winslow KL, Yang D, Blohm PL, et al.. Oocyte cryopreservation: a three year follow up of sixteen births. *Fertil Steril* 2001;76:S28
 21. Wu J, Zhang L, Wang X. In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 2001;121:389-93
 22. Chen SU, Lien YR, Tsai YY, Chang LJ, Ho HN, Yang YS. Successful pregnancy occurred from slowly freezing human oocytes using the regime of 1.5 mol/l 1,2-propanediol with 0.3 mol/l sucrose. *Hum Reprod* 2002;17:1412
 23. Porcu E, Fabbri R, Ciotti PM, et al.. Oocytes or embryo storage? *Fertil Steril* 2002;78:S15
 24. Yang D, Winslow KL, Blohm PL, et al.. Oocyte donation using cryopreserved donor oocytes. *Fertil Steril* 2002; 78:S14-15
 25. Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, Pasqualini RS. Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline- based freezing medium. *Hum Reprod* 2002;17:3149-52
 26. Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes result in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80:223-4
 27. Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, Cha KY. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2003;79:1323-6
 28. Fosas N, Marina F, Torres PJ, Jove I, Martin P, Perez N, Arnedo N, Marina S. The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes. *Hum Reprod* 2003;18:1417-21
 29. Boldt J, Cline D, Mc Laughlin D. Human oocytes cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2003;3;18:1250-5
 30. Porcu E. Human Oocyte Cryopreservation: From Basic Research to Clinical Application. ASRM 59th Annual Meeting, San Antonio, Texas, 2003, Octubre 11-15
 31. Bouquet M, Selva J, Auroux M. Cryopreservation of mouse oocytes: mutagenic effects in the embryo? *Biol Reprod* 1993;49:764-9
 32. Bouquet M, Selva J, Auroux M. Effects of cooling and equilibration in DMSO, and cryopreservation of mouse oocytes, on the rates of in vitro fertilization, development, and chromosomal abnormalities. *Mol Reprod Dev* 1995;40:110-5
 33. Dulioust E, Toyama K, Busnel MC, Moutier R, Carlier M, Marchaland C, Ducot B, Roubertoux P, Auroux M.. Long-term effects of embryo freezing in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:589-93
 34. Wennerholm UB. Cryopreservation of embryos and oocytes: obstetric outcome and health in children. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl 5):18-25

35. Trounson AO. Cryopreservation. *British Medical Bulletin* 1990;46:695-708
36. Grudzinskas JG & Yovich JL. *Gametes: The Oocyte*. Cambridge Reviews in Human Reproduction, Cambridge University Press. 1995
37. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;54:102-8
38. Songsassen N, Yu IJ, Ratterree MS, VandeVoort CA, Leibo SP. Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in rhesus monkey oocytes. *Fertil Steril* 2002;77:818-25
39. Gook D, Osborn S, Bourne H & Johnson W. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum Reprod* 1994;9:684-91
40. Ameida PA, Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 1995;3:357-65
41. Gook D (1996). Oocyte time-travel. *Alpha Newsletter* 1995;June 1996:1-3
42. Stachecki JJ (2001). Cryopreservation of Gametes. *Annual Review of Preimplantation Embryology*. Cancún, México, Enero 8-10.
43. Stachecki JJ, Cohen J, Willadsen SM. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology* 1998;37:346-54
44. Stachecki JJ y Willadsen SM. Cryopreservation of mouse oocytes using a medium with low sodium content: effect of plunge temperature. *Cryobiology* 2000;40:4-12
45. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Venturoli S, Flamigni C. Oocyte cryopreservation. *Hum Reprod* 1998;13:98-108
46. Rall WF y Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-5
47. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H.. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53-8
48. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes. *Nat Biotechnol* 1999;17:1234-6
49. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocyst of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996;54:1059-69
50. Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, Toner M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2000;18:145-6
51. The Practice Committee of the ASRM. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2004;82:993-8
52. Dawkins R. *Getting Off the Ground. En: Climbing Mount Improbable*. Penguin Books, London, 1996;pp. 99
53. Morris J. A novel approach to sperm cryopreservation. *Alpha Newsletter* 1998;12:5-6
54. Nagano MC. A surgical strategy using spermatogonial stem cells for restoring male fertility. In: *Preservation of Fertility*. Tulandi T y Gosden RG, Eds. Taylor & Francis, Londres. 2004
55. FIVNAT. Bilan des transferts d'embryons congelés de 1987 à 1994. *Contracept Fertil Sex* 1996;24:700-5
56. Cohen J, Inge K, Wiker S, Wright G, Fehilly CB, Turner TG Jr. Duration of storage of cryopreserved human embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1988;5:301-3
57. Matchinger R, Dor J, Levron J, Mashlach S, Levran D, Seidman DS. The effect of prolonged cryopreservation on embryo survival. *Gynecol Endocrinol* 2002;16:293-8
58. Wada I, Macnamee M, Wick K, Bradfield JM, Brinsden PR. Birth characteristics and perinatal outcome of babies conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 1994;9:543-6
59. Sutcliffe A, D'Souza S, Cadman J, Richards B, McKinlay IA, Lieberman B. Minor congenital anomalies, major congenital malformations and developmental in children conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 1995;10:3332-7
60. Sutcliffe A, D'Souza S, Cadman J, Richards B, McKinlay IA, Lieberman B. Outcome in children from cryopreserved embryos. *Arch Dis Child* 1995;72:290-3
61. Wennerholm U, Albertson-Wikland K, Bergh C, Hamberger L, Niklasson A, Nilsson L, Thiringer K, Wennergren M, Wikland M, Borres MP. Postnatal growth and health in children born after cryopreservation as embryos. *Lancet* 1998;351:1085-90
62. Glenister P, Whittingham D, Lyon M. Further studies on the effect of radiation during storage of frozen 8-cell mouse embryos at -196°C. *J Reprod Fertil* 1984;70:229-34
63. Go KJ, Corson SL, Batzer FR, Walters JL. Live birth from a zygote cryopreserved for 8 years.

- Hum Reprod 1998;13:2970-1
64. Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, Godoy H, PAsqualini RS. Birth of a healthy baby after transfer of embryos that were cryopreserved for 8.9 years. *Fertil Steril* 2002;77:1074-6
65. Glenister PH, Thornton CE. Cryoconservation –archiving for the future. *Mamm Genome* 2000;11:565-71
66. Clarke GN. Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination? *Hum Reprod* 1999;14:2941-3
67. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irwin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995;346:137-40
68. Hawkins AE, Zuckerman MA, Briggs M, Gilson RJ, Goldstone AH, Brink NS, Tedder RS. Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. *J Virol Methods* 1996;60:81-8
69. Bielanski A. A review on disease transmission studies in relationship to production of embryos by in vitro fertilization and to related new reproductive technologies. *Biotech Adv* 1997;15:633-56
70. Frodsham L y Gilling-Smith C. Assisted reproduction treatment in HIV infected couples: UK provision of care. *Hum Reprod* 2003;18 Suppl 1:xviii33 (O-096)
71. Hutchinson M (2003). Fertility clinics “risking HIV spread”. *BBC News* en: <http://news.bbc.co.uk/go/pr/fr/-/1/hi/health/3035388.stm> publicado el 01/07/03 a las 14:00:13 GMT
72. Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, DeVos A, Magli MC, Mandelbaum J, Selva J, van Inzen W. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod* 2000;15:2241-6