

Preservación de la fertilidad: congelamiento de espermatozoides y ovocitos.

Lic. Sabrina De Vincentiis

SEREMAS, Medicina para el Hombre y la Mujer.

Consideraciones durante la congelación y descongelación

VARIABLES:

- ✓ Naturaleza y concentración del crioprotector
- ✓ Temperatura a la cual se adiciona
- ✓ Tasa de descenso al congelar y ascenso de la temperatura al descongelar
- ✓ Proporción en la cual el crioprotector se remueve al descongelar
- ✓ Permeabilidad de la membrana plasmática al crioprotector

FACTORES QUE AFECTAN LOS RESULTADOS:

- ✓ Cantidad de hielo que se forma
- ✓ Localización de los cristales en relación con las células (en el interior o en el exterior de las mismas)
- ✓ Toxicidad de los crioprotectores según la concentración en la cual se los use
- ✓ Magnitud de los cambios inducidos en el volumen por la osmolaridad
- ✓ Permeabilidad de la membrana

Estas son algunas de las características y variables que se debieron considerar para evitar que la incorporación de los crioprotectores a las células al congelar y la eliminación de los mismos durante la descongelación a su vez no ocasionara la muerte de las células por shock osmótico.

Técnicas de Criopreservación

- ✓ **Congelación lenta o de equilibrio**

Se basan en la protección de las células a través de la deshidratación celular casi total y la formación controlada de hielo. Son los protocolos más conocidos y utilizados.

✓ Congelación ultra-rápida o vitrificación

Estas metodologías involucran el enfriamiento muy rápido, utilizando soluciones altamente concentradas que no cristalizan durante la congelación, mientras que la viscosidad aumenta con el descenso de la temperatura hasta la formación de un estado sólido amorfo o **vitrificado**. Los problemas asociados a esta forma de congelar son que al requerir altas concentraciones de crioprotector los tiempos de exposición deben ser muy cortos ya que son muy tóxicos y además se deben usar tasas de descenso de temperatura muy rápidas (- 2500 °C/ minuto) para evitar la formación de los cristales.

Preservación de la fertilidad

Cuando se habla de preservación de la fertilidad en general se piensa inmediatamente en pacientes que requieren tratamientos oncológicos. Y si bien este tipo de pacientes es el más interesante para poder aplicar los métodos de congelación de gametas, cabe remarcar que los pacientes que se pueden beneficiar de estos procedimientos de congelación son de diferentes tipos.

Existe mucha bibliografía referida a la probabilidad del daño reproductivo por los tratamientos oncológicos y como depende de la edad y del sexo del paciente además de la duración del tratamiento. Si bien la producción espermática se puede recuperar, está claramente demostrado que los ovocitos no se regeneran.

Por supuesto que el objetivo en estos pacientes es curar la enfermedad, aún cuando se cause esterilidad, sin embargo existen en la actualidad muchas opciones que pueden ayudar a algunos de estos pacientes a preservar la fertilidad antes de utilizar estos tratamientos.

Congelación de espermatozoides



En el caso de los varones, los protocolos de congelación de espermatozoides garantizan la congelación exitosa de las gametas casi sin excepción. Más allá de los sitios de obtención de la gameta según el tipo de paciente con el cual nos enfrentemos, debemos saber que existe la posibilidad de congelar los espermatozoides.

- Eyaculado: semen
- Retroeyaculación: orina
- Anaeyaculación: electroestimulación
- Epidídimo: punción
- Testículo: biopsia

Además la congelación de semen, si bien en estos casos no es una indicación o una necesidad, se torna una herramienta de suma utilidad para simplificar los procedimientos de ovodonación. En estos casos, se les ofrece a las parejas de las mujeres que recibirán óvulos donados, la posibilidad y la recomendación en realidad, de congelar su muestra de semen con anterioridad a la programación del ICSI. Así se ayuda un poco a disminuir el stress en estas parejas, que si no de otra manera deben estar pendientes de los avances en los controles de la donante complicándose los tratamientos. Al tener la muestra congelada, sobre todo en pacientes del interior, la programación es más sencilla y los pacientes sólo deben estar para la transfer embrionaria y no los días previos. Es decir que en estos casos si bien la intención de la congelación no es la preservación de la fertilidad, la utilidad concreta es evidente: simplificar los tratamientos para estas parejas.

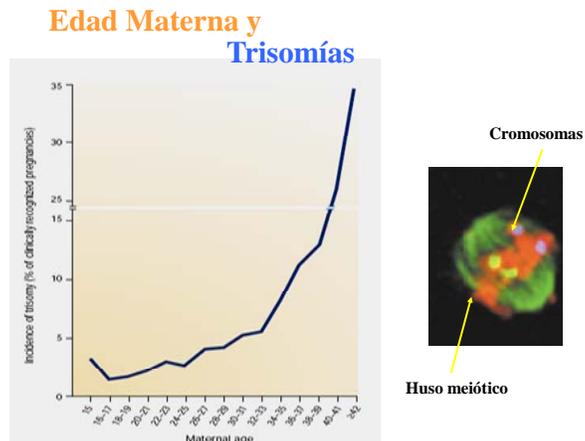


Congelación de Ovocitos

Durante muchos años, esta metodología fue el objetivo de la gente que trabaja en reproducción ya que de alguna manera complementa a la RA extendiendo su aplicación a mujeres que son fértiles ofreciéndoles la oportunidad de posponer su maternidad mediante la congelación de los óvulos.

Preservación de La fertilidad	Preservación de La fertilidad
<p>Ovocitos</p> <p>Puede ser utilizada para:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Evitar la congelación de embriones ✓ Rescate de ciclos con hiperestimulación, endometrio alterado ✓ Falla en la obtención de la muestra de semen ✓ Evitar la sincronización en donantes-receptoras <p>Reproducción Asistida</p>	<p>Ovocitos</p> <p>Puede ser utilizada para:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Postergar electivamente su maternidad ✓ Para preservar su fertilidad previo a un tratamiento oncológico <p>Mujeres Fértiles</p>

Sin embargo debemos tener muy presente cuando las mujeres consultan por este caso particular, que la edad de la mujer condiciona la fertilidad, por ello la recomendación de vitrificación con fines reproductivos debería ser en mujeres menores de 37 años.



Las consecuencias que la congelación tradicional tenía sobre los óvulos pueden resumirse en las siguientes:

- **Endurecimiento de la Zona Pelúcida:** cuando la técnica de ICSI aun no había sido desarrollada, este efecto provocaba que la fertilización por FIV de los óvulos que habían sido congelados fuera extremadamente baja, ya que al endurecerse la estructura proteica que recubre a los óvulos y se llama zona pelúcida, los espermatozoides no podían fertilizar correctamente. Este punto fue superado perfectamente al utilizar la técnica de ICSI para lograr la fertilización de los óvulos descongelados que sobrevivían.
- **Disrupción de la membrana plasmática:** la congelación de una célula del tamaño del óvulo humano originó muchos problemas en la metodología ya que la relación volumen-superficie no es la más común y, por lo tanto la cantidad de hielo que se formaba en el interior de los óvulos hacía que al momento de descongelar la sobrevivida fuera muy baja sobre todo por el daño a la membrana plasmática ocasionado por los cristales de hielo. La técnica que originalmente se usaba para congelar óvulos era la congelación lenta. En la actualidad este problema se evita vitrificando con los nuevos protocolos desarrollados.
- **Daño irreversible del huso:** la característica indiscutible del óvulo maduro, es decir en el estadio de metafase II, es que sus cromosomas se encuentran expuestos sobre la estructura del huso meiótico. De esta manera, el material genético ovocitario no está protegido por la membrana nuclear. Esto determina que al congelar, esta estructura del huso meiótico y los cromosomas asociados se desorganice y en general se dañe y por lo tanto, si el óvulo sobrevive, no pueda fertilizar de manera normal o si lo hace, los embriones que se origina tengan gran incidencia de aneuploidías como lo demostraron muchos trabajos publicados por la década de los noventa. Es decir que aparentemente era reducido el desarrollo

embrionario exitoso luego de la congelación de óvulos con los protocolos convencionales.

- Desorganización extensiva del ooplasma: el óvulo presenta una estructura citoplasmática altamente polarizada, es decir organizada de determinada manera que es fundamental para el desarrollo embrionario posterior. Al congelarlos, se demostró que la formación del hielo intracelular desplaza, moviliza y altera estas “ubicaciones” precisas que el óvulo tiene en su citoplasma y por lo tanto, una vez más, el desarrollo embrionario se veía afectado.
- Formación de subnúcleos o fertilización triploide: como consecuencia de la desorganización del huso meiótico, la característica más fácil y común de ver era la fertilización anómala.
- Nacimientos con esta técnica: los trabajos publicados desde los comienzos de la congelación de esta gameta demostraron que si bien la eficiencia de la sobrevivida iba mejorando a lo largo de los años, la tasa de nacidos vivos no. Por este motivo es que se vuelve a explorar la congelación por vitrificación y hasta no hace muchos años, la congelación de óvulos no podía considerarse una práctica de rutina para los laboratorios de Reproducción Asistida y ofrecida a los pacientes como una práctica segura. Esto cambió radicalmente alrededor de 2004 con los nuevos procedimientos de vitrificación.

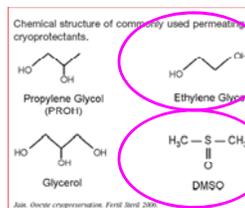
Resultados

FERTILITY AND STERILITY®
 VOL. 80, NO. 1, 2003
 Copyright ©2003 American Society for Reproductive Medicine
 Published by Elsevier Inc.
 Printed on acid-free paper in U.S.A.

2003

High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy

K. Paul Katayama, M.D., Ph.D.^a
 Joni Stehlik, B.S.^a
 Masahige Kawayama, Ph.D.^b
 Osamu Kato, M.D.^b
 Ed Stehlik, B.S.^a



MVE
 Mínimo
 Volumen
 de Enfriamiento

Caso Clínico

Vitrificación de ovocitos: Primer embarazo evolutivo en Argentina utilizando esta técnica

Sabrina De Vincenti; Santiago Brigo Olmedo.

SEREMAS, Medicina para el Hombre y la Mujer.
Reproducción 2009; 34: 20-24

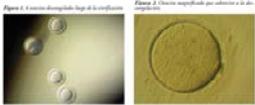


Figura 1. Control de la calidad de la ovulación. Figura 2. Ovocito madurado por ultrasonido a la día siguiente.



Figura 3. Frotis de los tres embriones obtenidos. Figura 4. Frotis de un embrión tras su congelación.



Criopreservación de ovocitos

Conclusiones

Essential elements of informed consent for elective oocyte cryopreservation: a Practice Committee opinion

The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine
American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama

Women who may be considering oocyte cryopreservation, an experimental procedure, must understand and be fully informed about the potential benefits, limitations, and risks of this developing technology, as well as the clinical outcomes that reasonably can be expected. (Fertil Steril® 2008;90:S134-5, ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

Oocyte cryopreservation is an experimental procedure that should not be offered or marketed as a means to defer reproductive aging, primarily because data relating to clinical outcomes are limited (1). Nonetheless, many women understandably have interest in this emerging technology and



La vitrificación, forma de criopreservación especial que evita completamente la formación de cristales intracelulares, es al menos en este momento el método más adecuado para congelar a la gameta femenina y que ésta sobreviva, fertilice correctamente y sea capaz de originar embarazos viables con descendencia viva. Si bien las sociedades internacionales como la ASRM y la ESHRE recomiendan cautela en su aplicación debido fundamentalmente a que el follow up de los niños nacidos por esta técnica es aún muy insuficiente para llamarla “segura”, ya que muchas enfermedades son de aparición tardía, la realidad es que la mayoría de los centros han comenzado a implementarla.

De esta manera, mujeres que desean posponer su maternidad, parejas que tienen reparos en la congelación de embriones, mujeres que durante la estimulación de la ovulación respondan de manera exacerbada (síndrome de hiperestimulación de la ovulación –SHO-) o que su calidad endometrial no sea la adecuada, pueden utilizar la vitrificación de óvulos como alternativa. Por supuesto en algunos de estos casos como el SHO o la mala calidad endometrial, la congelación de embriones para evitar la transferencia es la opción más común, pero debemos saber que a estas parejas también les podemos ofrecer esta otra alternativa.

Otro uso de la vitrificación de óvulos, es para los ciclos de donación. Generalmente se realizan los procedimientos de donación de óvulos sincronizando a la donante con sus receptoras. Esto a veces acarrea algunos problemas de fechas; de cancelaciones de la paciente receptora porque la donante no tuvo suficientes óvulos; sangrado del endometrio de la receptora justo cuando se están ya por obtener los óvulos de su donante, etc. Estos potenciales problemas se podrían evitar teniendo los óvulos de las donantes vitrificados y disponibles para ser usados cada vez que una receptora los necesitara.



Como conclusión, la congelación de gametas es una realidad. Sobre todo para los varones esta herramienta abre las puertas a que pacientes tan disimiles como un marido de una receptora, como un varón azoospermico o uno que requiere un tratamiento oncológico, se beneficien con la criopreservación de espermatozoides. No debería ocurrir que no se les ofrezca a estos hombres la congelación como una opción válida y completamente segura.

En el caso de las mujeres, aquellas que estén atravesando por tratamientos oncológicos son quizás los casos más delicados ya que dependerá de si es posible o no realizar la estimulación de la ovulación. Si esto es posible, se obtienen los óvulos y se los congela sabiendo que (según la edad de la mujer) tendrá buenas chances. Si por el contrario no fuera posible, se deberá evaluar si se recomienda o no la congelación de tejido ovárico, sabiendo que aun esta técnica se encuentra claramente en el campo experimental. Para el resto de los casos, la vitrificación de óvulos sería la sugerencia que parece ser la más adecuada al menos en la actualidad.