

CRIOPRESERVACIÓ I TÈCNiques DE REPRODUCCIÓ ASSISTIDA

MIQUEL SOLÉ,¹ MONTSE BOADA¹ I ANNA VEIGA^{1,2}

¹ *Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció; Institut Universitari Dexeus.*

² *Banc de Línies Cellulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Miquel Solé. Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció; Institut Universitari Dexeus. Gran Via Carles III, 71-75. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: miqsol@dexeus.com.

RESUM

La criopreservació és la preservació de la funcionalitat de les cèl·lules o teixits mitjançant la reducció de la temperatura per sota del punt on les reaccions químiques poden tenir lloc. D'aquesta manera es poden mantenir durant llargs períodes de temps mantenint la seva viabilitat, encara que aquesta pot estar compromesa per l'efecte negatiu que causa el descens de temperatura i també durant el retorn a la normotèrmia. És una part essencial de les tècniques de reproducció assistida. La criopreservació de semen facilita en gran mesura la planificació dels cicles de fecundació *in vitro* i la utilització de semen de donant i ha donat lloc a milers de nens nascuts sans, ja que augmenta les taxes d'embaràs acumulat per punció folicular. Actualment els embrions sobrants són criopreservats rutinàriament en els laboratoris de fecundació *in vitro*. Els naixements a partir d'embrions criopreservats representen al voltant del 8 % del total de nens nascuts amb les tècniques de reproducció assistida. La criopreservació d'òocits i teixit ovàric està adquirint un paper protagonista en els últims anys i està centrant tots els esforços per a l'optimització dels procediments, ja que ofereix grans possibilitats per als pacients que volen preservar la fertilitat.

Paraules clau: bioseguretat, criopreservació, crioprotector, oncofertilitat, vitrificació.

CRYOPRESERVATION AND ASSISTED REPRODUCTION TECHNIQUES

SUMMARY

Cryopreservation is the preservation of the viability of cells and tissues by means of temperature reduction of the under the point where chemical reactions take place. Their viability can be preserved during long time although this state can be involved by the negative effect caused by temperature decrease and also by the return to normotermia. Semen and embryo cryopreservation has been an essential techniques of reproduction attended. Se-

men cryopreservation facilitates in great measure the planning of the cycles of fertilization in vitro mainly when donor semen is used. Embryo cryopreservation of embryos has given rise to thousands of healthy born children, enlarging accumulated rates of pregnancies by follicular puncture. Today, the surplus embryos are routinely cryopreserved in IVF laboratories. Births from cryopreserved embryos represents 8% of born children by using assisted reproduction techniques. Actually oocyte and ovarian tissue cryopreservation are acquiring high relevance and are centering all the efforts for protocol optimization since offer large possibilities for patients who want to preserve their fertility.

Key words: biosecurity, cryopreservation, cryoprotectants, oncofertility, vitrification.

INTRODUCCIÓ

La criobiologia és l'aplicació de baixes temperatures en materials biològics, l'objectiu del qual és la conservació de les cèl·lules vives amb el manteniment de la seva funcionalitat. Es tracta d'una ciència pluridisciplinària que estudia el comportament de les cèl·lules i teixits a baixes temperatures ($< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). El metabolisme celular disminueix críticament i així permet preservar durant llargs períodes de temps la seva viabilitat potencial.

La criobiologia i les tècniques de reproducció assistida (TRA) han evolucionat en gran mesura de manera paral·lela durant els últims cinquanta anys. El tret de sortida el va donar el descobriment del glicerol com a agent crioprotector. Va ser l'any 1949 quan es va aconseguir criopreservar amb èxit semen d'au mitjançant la introducció del glicerol (Polge *et al.*, 1949). Aquest fet va suposar un gran impuls per a la comprensió dels efectes biològics de la criopreservació i va donar lloc a una sèrie d'importants descobriments durant els anys posteriors. Es van estudiar els danys cel·lulars deguts a la formació de gel intracel·lular i extracel·lular, a la citotoxicitat dels diferents crioprotectors i a canvis d'osmolaritat. En els inicis de la dècada dels setanta es va introduir el dimetilsulfòxid (DMSO) com a crioprotector en la criopreservació d'embrions de rato-

lí (Wilmut *et al.*, 1972), molt utilitzat actualment en la tècnica de vitrificació. A partir d'aquest moment molts investigadors van aprofundir en l'estudi dels protocols de congelació/descongelació i dels diferents crioprotectors. El primer naixement a partir d'embrions de ratolí criopreservats es va aconseguir el mateix any (Whittingham *et al.*, 1972). El mètode descrit per Whittingham tenia una durada d'unes 2-3 hores, per minimitzar la formació de gel en l'interior de les cèl·lules. Aquest protocol original és el que va ser emprat durant anys en la criopreservació lenta per a embrions primerencs humans, en el quals s'aplicaven taxes de refredament de $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fins a assolir la temperatura de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Als pocs anys es va descobrir que si s'aplicaven taxes de descongelació ràpida ($350\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) la taxa de refredament podia accelerar-se a partir dels $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En la dècada dels vuitanta ja es va incorporar en humans la criopreservació d'embrions com a procediment habitual en les TRA. El 1983 Trounson i Mohr van publicar el primer embaràs en humans a partir d'embrions primerencs criopreservats. El primer naixement es va publicar l'any següent (Zeilmaker *et al.*, 1984).

En anys posteriors es va aprofundir en el coneixement dels crioprotectors presents també en insectes com a sistema de defen-

sa contra els canvis extrems de temperatura (Pegg *et al.*, 1987).

El mètode alternatiu a la congelació lenta és conegut amb el nom de *vitrificació*, terme utilitzat per a la solidificació de sistemes sense formació de gel. Ja l'any 1934, Luyet va estudiar la possibilitat de vitrificar el material biològic per evitar així l'efecte negatiu que suposa la formació de gel durant la congelació/descongelació. Aquesta tècnica es basa en l'aplicació d'altres taxes de refredament amb l'ús de solucions altament tòxiques, amb altes concentracions de crioprotector. Aquest mètode va caure en l'oblit fins que Rall i Fahy van disminuir la citotoxicitat de les solucions crioprotectors modificant també els temps d'exposició. Van vitrificar amb èxit embrions de ratolí centrant la seva atenció a escurçar el temps d'exposició a les solucions amb altes concentracions de crioprotector.

L'any 1990 es van desenvolupar solucions crioprotectors amb menor citotoxicitat basades en tampó fosfat, etilenglicol (EG), ficol i sacarosa. La presència de macromolècules no permeables a la membrana de les cèl·lules disminuïa la toxicitat de les solucions. Van arribar a la conclusió que el temps òptim d'equilibrament amb la solució de vitrificació era dependent de la temperatura a la qual es realitzava el procés (Kasai *et al.*, 1990).

En el context de la reproducció assistida tant les cèl·lules (espermatòzoides, oòcits i embrions) com els teixits (teixit ovàric i gonadal) poden ser criopreservats amb èxit amb els dos mètodes. Pel que fa als oòcits, ha estat en els últims anys quan s'han aconseguit optimitzar els protocols i s'han millorat significativament els resultats.

PRINCIPIS BÀSICS DE LA CRIOPRESERVACIÓ

Independentment de la metodologia utilitzada per a la criopreservació, com a conseqüència del refredament es produeixen uns efectes deleteris en els gàmetes i embrions que en poden comprometre la supervivència i la viabilitat. Durant la criopreservació, les cèl·lules s'exposen a un gran estrès mecànic, tèrmic i químic (Fuller *et al.*, 2004).

Els punts principals del procés, que són comuns als diferents mètodes de criopreservació, són el següents:

- Incorporació de crioprotectors prèviament al refredament.
- Descens de temperatura fins a la immersió en nitrogen líquid ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Escalfament de la mostra fins a la temperatura fisiològica ($36,8\text{-}37\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Extracció del crioprotector de l'interior de les cèl·lules.

Aigua i formació de gel

És conegut des de fa molts anys l'efecte que té el descens de la temperatura en les cèl·lules. Es produeix un descens de les reaccions químiques i disminueix el metabolisme cel·lular fins que queden totalment inactives.

L'estat sòlid de l'aigua, el gel, es produeix per la formació de ponts d'hidrogen entre les molècules d'aigua. És un enllaç intermolecular que forma una estructura semblant a un rusc d'abelles. L'aigua arriba a la seva densitat màxima a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i es va expandint a mesura que es congela. La seva energia cinètica és molt baixa i les molècules estan gairebé immòbils. Tot i així, es pot aconseguir un estat de sobrefredament, és a dir, pot romandre en estat líquid fins a una temperatura de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El punt de congelació d'una solució és inversament proporcional a la concentració de soluts. En una suspensió cel·lular l'inici de la formació de nuclis de gel s'inicia aleatòriament en el medi extracel·lular entre els -5 i -15 °C; aquest fenomen es coneix amb el nom de *nucleació*. Inicialment es dona en el medi extracel·lular, ja que és on hi ha més quantitat d'aigua lliure.

Posem com a exemple una solució aquosa isotònica (300 mOsm/kg); la formació de gel en aquesta solució es produeix a -10 °C. Això produeix un augment d'osmolaritat en el medi, que es manté líquid i promou la deshidratació de les cèl·lules per la sortida d'aigua a través de la membrana al medi extracel·lular. La part de la solució que es manté en estat líquid es va tornant cada cop més viscosa per augment de la concentració de soluts. A -130 °C el poc medi que resta en estat líquid i les cèl·lules vitrifiquen conjuntament. La temperatura a la qual es produeix la cristallització/vitrificació dependrà dels soluts dissolts a la solució. El punt eutèctic d'una solució reflecteix la màxima concentració de soluts a la qual pot arribar la solució abans que solidifiqui.

Paper dels crioprotectors

Els crioprotectors són substàncies utilitzades per a la protecció de cèl·lules i teixits del dany que es produeix durant la congelació, principalment a causa de la formació de gel. Hi ha molts éssers vius (entre els quals trobem alguns insectes, peixos, amfibis i rèptils) que produeixen aquestes substàncies en els seus organismes com a protecció enfront de condicions ambientals extremes, com les baixes temperatures o la deshidratació. En el cas dels insectes, aquests normalment utilitzen sucres com a agents crioprotectors; les granotes de l'Àrtic utilitzen

glucosa i les salamandres de l'Àrtic sintetitzen glicerol en el fetge.

No es coneix molt bé el funcionament dels crioprotectors, per la dificultat que suposa l'estudi a baixes temperatures. Els crioprotectors alteren les propietats fisicoquímiques de les solucions on es troben les cèl·lules o teixits. Es tracta de molècules hidrosolubles i de baixa toxicitat. Disminueixen el punt eutèctic de les solucions. Això suposa assolir una concentració de soluts a una temperatura menor i fa que la cèl·lula estigui més deshidratada i sotmesa a un gradient osmòtic menor. Disminueixen la temperatura a la qual es produeix la transició de l'aigua d'estat líquid a sòlid i interaccionen amb les molècules d'aigua, i redueixen la capacitat de formar ponts entre aquestes. També estableixen ponts d'hidrogen amb molècules biològiques i desplacen les molècules d'aigua, de manera que impedeixen que les proteïnes o el DNA perdin la seva estructura terciària, és a dir, la seva estructura fisiològica nativa i la seva funcionalitat.

La barreja de dos o més crioprotectors implica una disminució de la citotoxicitat i n'augmenta l'efectivitat. La utilització de dos crioprotectors és comuna en la tècnica de vitrificació.

Els crioprotectors es poden classificar en dos grups en funció de la permeabilitat a la membrana cel·lular: permeables i no permeables.

El crioprotectors permeables són de baix pes molecular, i són capaços de travessar la membrana de les cèl·lules. Entre aquests, els més comuns són els glicols (alcohols amb dos grups hidroxils com a mínim), entre els quals es troben l'etilenglicol (EG), el propandiol (PROH) i el glicerol. El dimetilsulfòxid (DMSO) és actualment un crioprotector molt utilitzat. Aquests crioprotectors actuen amb diferents mecanismes: baixen el punt de congelació de la solució, interac-

cionen amb la membrana mantenint la seva estructura i prevenen l'exposició a altes concentracions d'electròlits tant intracel·lulars com extracel·lulars, ja que són capaços d'unir-se a aquests.

Els crioprotectors no permeables són compostos d'alt pes molecular que normalment s'utilitzen associats amb els agents crioprotectors permeables. No es tracta pròpiament de crioprotectors, sinó que exerceixen el seu efecte crioprotector promovent una ràpida deshidratació cel·lular i augmentant el gradient osmòtic. Els més comuns són els sucres com la sacarosa o la glucosa, però també s'utilitzen altres macromolècules com la polivinilpirrolidona (PVP), el ficol i proteïnes d'alt pes molecular.

BIOSEGURETAT I EMMAGATZEMATGE EN NITROGEN LIQUID

La bioseguretat és l'aplicació de coneixements, tècniques i equipament per prevenir l'exposició a agents potencialment peril·losos, considerats de risc biològic. També cal tenir en compte els possibles efectes negatius del nitrogen líquid en el personal de laboratori si no es fa una bona manipulació del mateix.

Risc físic i químic

El nitrogen líquid és un producte potencialment perillós a causa de les seves característiques fisicoquímiques: és extremadament fred, a pressió atmosfèrica bull a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, genera grans quantitats de vapor de nitrogen i produeix una disminució de la concentració d'oxigen en l'ambient. Com que és inodor, incolor i insípid, es respira normalment com si es tractés d'aire a concentracions normals d'oxigen. Per aquest

motiu és important que la sala criogènica estigui ben ventilada. És recomanable disposar d'un oxímetre que permeti monitoritzar el nivell d'oxigen en l'ambient. Si no hi ha una ventilació adequada la intoxicació per vapors de nitrogen pot provocar mareig, debilitació o desmaís en el personal de laboratori.

Cal evitar-ne la manipulació sense una protecció adient, ja que amb el contacte amb la pell pot produir cremades.

Risc de contaminació creuada

El nitrogen és utilitzat per a la criopreservació de gàmetes, embrions i teixits. Pot constituir una font de contaminació en si mateix o de contaminació creuada (entre diferents mostres criopreservades) si no es manipula adequadament. En l'àmbit de la reproducció assistida, tot i que no s'ha publicat cap cas de contaminació creuada i la probabilitat que es produeixi és molt baixa, el risc no és nul. És important seguir les normes de bioseguretat i bona pràctica.

La contaminació creuada pot produir-se en els següents casos:

- A partir de mostres contaminades com en el cas del semen. S'han de manipular les mostres amb precaució per no contaminar exteriorment el suport.

- La utilització de medis de cultius contaminats.

- Fractura de l'envàs ja emmagatzemat en el nitrogen líquid.

- Tancament o segellament dels suport de manera errònia.

- Utilització de nitrogen líquid contaminat durant el procés de congelació o per una mala gestió de la font de nitrogen per part dels proveïdors.

- La mala qualitat de l'aire en la zona de congelació pot ser una possible font de contaminació.

— El personal de laboratori per via aèria o per descamació de la pell durant el processament de les mostres, o durant la manipulació del contingut dels tancs criogènics.

Existeixen diversos microorganismes com fongs (*Aspergillus*), virus (hepatitis, VIH, papovavirus, virus herpes simplex i adenovirus) i bacteris, que poden sobreviure a l'exposició directa al nitrogen líquid i ser els causants d'una contaminació. Per evitar una contaminació originada a partir del nitrogen líquid s'han proposat diferents mètodes d'esterilització amb mètodes d'ultrafiltració o mitjançant la radiació ultraviolada. Aquests mètodes són objecte d'investigació avui dia, per l'alt cost que tenen.

Una estratègia que s'està estenent actualment, és la utilització de vapors de nitrogen (VNL) per a la criopreservació i emmagatzematge. Tot i que s'han aconseguit aïllar alguns patògens en els VNL, la possibilitat de contaminació creuada disminueix enormement. Cal tenir en compte que és més probable que es produeixin fluctuacions de temperatura que podrien afectar la preservació de les mostres, però recentment s'han desenvolupat tancs que han demostrat mantenir una temperatura adequada i homogènia.

Pel que fa al suport de les mostres de semen, oòcits i embrions, l'any 1995 es van introduir al mercat palletes d'alta seguretat fetes amb resina ionomèrica, material irrompible a -196°C . També es van comercialitzar segelladores específiques de calor que oferien la màxima seguretat, ja que eren resistents a pressions de 150 kg/cm. Els estudis amb aquests sistemes han revelat que no existeix possibilitat de contaminació vírica o bacteriana en cap sentit. Aplicat a la tècnica de vitrificació també s'han comercialitzat alguns suports que garanteixen la bioseguretat.

Tancs de nitrogen líquid

S'han comercialitzat tancs de diferents mides i característiques que garanteixen el manteniment de les mostres a temperatures adequades. Estan fabricats amb una doble camisa aïllant amb un espai on s'ha aplicat el buit. Contenen al seu interior uns sistemes d'acer inoxidable per dipositar els vials o suports amb les mostres biològiques.

L'emmagatzematge de les mostres requereix temperatures inferiors a -130°C , temperatura de transició del gel en aigua, que assegura, així, l'absència de reaccions químiques. El sistema més senzill i segur existent actualment és el nitrogen líquid. Les úniques reaccions que es poden produir són la lenta acumulació de radiacions ionitzants, però aquesta acumulació probablement només és significativa si es manté durant segles (Mazur *et al.*, 1984).

MÈTODES DE CRIOPRESERVACIÓ

Actualment existeixen dos mètodes àmpliament utilitzats pels centres de reproducció assistida: la congelació lenta i la vitrificació. A diferència de la vitrificació, en la congelació lenta s'equilibren les cèl·lules amb la solució crioprotectora. El principis fonamentals que determinen la supervivència són comuns per als dos mètodes, i existeixen múltiples factors que influeixen en l'èxit de la criopreservació.

Congelació lenta o convencional

Les mostres, prèviament al refredament, s'exposen a la solució crioprotectora (1-2 M), que és hiperosmòtica (> 300 mOsm) i aquestes cèl·lules responen al canvi osmòtic deshidratant-se amb la pèrdua d'aigua a través de la membrana, i incorporant al ma-

teix temps el crioprotector. La taxa de deshidratació i d'incorporació del crioprotector dependrà de les propietats de la membrana, dels crioprotectors i de la temperatura. El coeficient de permeabilitat de membrana varia per als diferents estadis embrionaris, i també són diferents per a l'òocit i els altres tipus cel·lulars. Els crioprotectors no són citotòxics en si mateixos, sinó que el dany cel·lular pot produir-se per un xoc osmòtic per una pressió osmòtica excessivament elevada entre la solució intracel·lular i extracel·lular. Aquest fenomen es pot donar tant durant l'equilibrament previ o després de la descongelació. Just abans de començar la congelació l'embrió ha d'arribar a una situació d'equilibri dins i fora de la cèl·lula, i s'ha d'igualar la pressió osmòtica entre el citoplasma i la solució on es troba en suspensió. En la descongelació l'aigua pot entrar més ràpidament que la sortida del crioprotector, i el volum pot augmentar fins que es produeixi la lisi de la cèl·lula.

El temps necessari perquè es produeixi l'equilibrament i la dilució del crioprotector dependrà de la permeabilitat als crioprotectors, la temperatura a la qual es realitza el procés, la concentració de crioprotector i el tipus cel·lular.

Actualment en els protocols utilitzats amb congeladors programables les taxes de refredament inicials són de 0,3 °C/min fins que s'assoleix una temperatura de -30 °C, temperatura a la qual ja es pot incrementar la taxa de refredament fins a 50 °C/min fins a la temperatura de -150 °C. A aquesta temperatura els embrions ja se submergeixen en nitrogen líquid.

Unes taxes de refredament massa elevades poden lisar les cèl·lules, per la formació de gel intracel·lular. Contràriament, amb unes taxes massa lentes de refredament la mort cel·lular es produeix per una exposició prolongada a condicions hiperosmòtiques. La taxa òptima de refredament depèn dels

següents factors: la relació superfície/volum de la cèl·lula, la permeabilitat de membrana, el tipus de crioprotector i la seva concentració.

Per evitar la formació de gel intracel·lular s'indueix la formació de gel en el medi extracel·lular a -7 °C, fenomen conegut amb el nom de *seeding*. Es promou també un augment en la concentració de soluts en la solució que no solidifica, i d'aquesta manera es facilita la deshidratació de les cèl·lules i s'evita la formació de gel en el seu interior. La temperatura òptima per al *seeding* es va determinar experimentalment tenint en compte la temperatura a la qual s'inicia la formació de gel espontàniament. Es va arribar a la conclusió que la temperatura òptima es troba entre els -5 °C i -7,5 °C. Es fa per contacte directe, amb un material extremadament fred, sobre una part de la solució propera a la mostra.

La taxa de recuperació de temperatura durant la descongelació depèn de la taxa de refredament durant la congelació. Unes taxes baixes de refredament durant la congelació fins a -30 °C requereixen altes taxes d'escalfament (200-350 °C/min). Si la congelació lenta és fins a -60 °C la velocitat d'escalfament ha de ser també més lenta, per sota dels 25 °C/min.

Finalment, un altre aspecte molt important durant la descongelació és la dilució dels crioprotectors. La utilització de crioprotectors no permeables permet accelerar el procés i evita que es produeixi el xoc osmòtic.

El suports més utilitzats en la congelació lenta són les palletes de 0,5 ml. Originàriament estaven fetes de policlorur de vinil (PVC), però el 1998 es van descartar perquè no es podien esterilitzar adequadament. Actualment es fabriquen amb glicol de tereftalat de polietilè (GTP). Són més fràgils que els criotubs (utilitzats en la criopreservació de semen), i per això s'han de mani-

pular amb molta cura un cop congelades, per la rigidesa que adquireixen. El sistema més segur de segellament és per calor.

Vitrificació

És un mètode alternatiu a la congelació lenta, i està adquirint un paper protagonista en els últims anys. El seu principi bàsic és evitar la formació de gel tant en el citoplasma com en la solució extracel·lular mitjançant l'aplicació d'altres taxes de refredament juntament amb la utilització de solucions amb altes concentracions de crioprotector. A diferència de la congelació lenta, la deshidratació de les cèl·lules es produeix just abans de la baixada de temperatura exposant les cèl·lules a altes concentracions de crioprotector. La vitrificació es pot definir com la solidificació d'una solució per un augment extrem de la viscositat. L'inconvenient principal és la necessitat d'exposar les cèl·lules a concentracions elevades de crioprotector (4-8 M), concentracions que poden resultar citotòxiques. La investigació en aquest camp ha fet possible limitar la toxicitat utilitzant dos crioprotectors permeables simultàniament. Això permet disminuir la concentració necessària de cadascun i el temps d'exposició. També permet poder utilitzar-los a temperatures inferiors, cosa que en disminueix la toxicitat. La combinació de dos crioprotectors augmenta la velocitat a la qual la cèl·lula els pot incorporar.

Entre els crioprotectors permeables més utilitzats trobem el DMSO, l'etilenglicol i el propilenglicol. Entre els no permeables, la sacarosa. Els medis de vitrificació també se suplementen normalment amb altres macromolècules, com la PVP o el ficol.

Per prevenir la formació de gel és molt important la taxa de refredament, i depèn en gran mesura del suport utilitzat per a

la vitrificació. És necessari vitrificar en volums molt baixos per assolir taxes de refredament elevades. Actualment existeixen molts suports, i es poden classificar en sistemes tancats i oberts. Tots els sistemes estan concebuts per poder aconseguir altes taxes de refredament minimitzant el volum de medi en el qual es vitrifica. Els més utilitzats són els sistemes oberts, que impliquen el contacte directe amb el nitrogen líquid i garanteixen així unes taxes de refredament adequades. El principal problema és una possible contaminació de les mostres. Entre els sistemes més utilitzats trobem: l'*open pulled straw* (OPS), la reixa de coure utilitzada en microscòpia electrònica, el *cryoloop* i el *cryotop*.

L'OPS es basa en l'escalfament d'una pal·leta convencional, que permet estirar-la i disminuir-ne així el diàmetre i conseqüentment, el volum en el qual es vitrifiquen les mostres (Vatja *et al.*, 1998). La reixa de microscòpia electrònica va ser descrita per primer cop el 1992. Es va aplicar en embrions de *Drosophila* i es van obtenir unes taxes de refredament tres cops superior que amb les palletes convencionals (Mazur *et al.*, 1992). En els últims anys s'ha aplicat majoritàriament en la vitrificació de blastocists. El *cryoloop* consisteix en un bucle de niló de 0,5-0,7 mm de diàmetre el qual, un cop submergit en nitrogen líquid, s'introdueix en un vial prèviament refredat (Kasai *et al.*, 2002). El sistema més nou, recentment comercialitzat, és el *cryotop*, que s'ha estès molt pels bons resultats publicats quan s'aplica tant a oòcits com a embrions (Kuwayama *et al.*, 2006).

Recentment s'han desenvolupat sistemes tancats que impedeixen possibles contaminacions com el High Security Vitrification kit (HSV, CBS) i el Cryotip. S'evita el contacte directe amb el nitrogen líquid, però la taxa de refredament disminueix, i això pot comprometre'n la viabilitat, sobretot en

el cas dels oòcits, que són cèl·lules més termosensibles. Resulta necessari optimitzar aquests sistemes, ja que són els únics que garanteixen el compliment complet de les normes de bioseguretat.

CRIOPRESERVACIÓ DE SEMEN O TEIXIT TESTICULAR

El primer embaràs registrat en humans amb semen congelat fou l'any 1953 (Sherman *et al.*, 1953). La criopreservació de semen i la utilització posterior va causar un gran impacte en la reproducció humana i de mamífers. La primera congelació es va realitzar amb gel sec. Uns anys més tard es va posar a punt la tècnica amb vapors de nitrogen líquid i es va aconseguir descendència sana. La primera vitrificació de semen es va realitzar l'any 1938. Va ser en granotes, però en aquests primers passos es van obtenir baixes taxes de supervivència. No s'aconseguien unes taxes de refredament adequades, i calia afegir quantitats de crioprotector no tolerades pels espermatozoides.

El primer banc de semen es va crear a Califòrnia el 1977. Fins a mitjan anys vuitanta va haver-hi una gran expansió en l'establiment de bancs de semen als EUA i França. Fins a la segona meitat dels vuitanta no es va establir la necessitat de mantenir en quarantena les mostres per evitar la transmissió del virus de la immunodeficiència adquirida (VIH).

Existeixen dos tipus de bancs de semen: el que conserven mostres provinents de pacients que requereixen els serveis de reproducció assistida per diferents motius, i els bancs de semen de donants. Aquests últims s'encarreguen de la selecció, criopreservació i distribució de les mostres de semen de donants.

Actualment existeixen cinquanta-tres

bancs de semen autoritzats a Espanya per a ús reproductiu (MSC, registre de centres, 2003). L'acceptació per part dels centres depèn del resultat d'una exploració física i l'anamnesi completa, incloent-hi la història familiar. Els donants són testeats per als antígens de l'hepatitis B, anticossos antihepatitis C, anticossos anti-HIV1/2, *Clamidia*, anticossos antiherpesvirus, sífilis, gonorrea i citomegalovirus.

Indicacions

Els bancs de semen estan indicats en els casos següents:

- Congelació per la dificultat d'obtenció de la mostra el dia de la punció follicular.
- Per la possibilitat de no poder estar presents el dia de l'obtenció dels oòcits.
- Pacients inclosos en les llistes d'espera en els programes de donació d'oòcits.
- Prèviament a tractaments de quimioteràpia o radioteràpia.
- Per la mala qualitat de la mostra.
- En els casos en els quals és necessari realitzar biòpsia testicular o aspiració de l'epidídim per a l'obtenció d'espermatozoides és recomanable criopreservar la polpa testicular.

Metodologia

La supervivència de les suspensions d'espermatozoides no està molt influïda per les taxes de refredament. Els diferents protocols ofereixen unes taxes de supervivència molt similars. Tots els mètodes requereixen els passos següents:

- Dilució de la mostra o disgregament de teixit amb una solució crioprotectora.
- Congelació amb diferents mètodes (vapors de nitrogen líquid, formació de perles en gel sec o congelador programable).

— Identificació i emmagatzematge en recipients adequats.

— Descongelació i rentatge de la mostra amb l'extracció del crioprotector.

En el cas de la criopreservació de polpa testicular és necessària la disgregació prèvia del teixit; el procediment posterior és similar a la criopreservació de mostres de semen.

La solució crioprotectora ha de ser isosmòtica respecte al plasma seminal, amb un pH proper a la neutralitat. Han d'incorporar nutrients amb aport energètic, com glucosa, fructosa o manosa. També conté un antibiòtic d'ampli espectre per prevenir possibles contaminacions. Els crioprotectors més utilitzats són el glicerol i el rovell d'ou.

El procés de congelació/descongelació produeix alteracions cel·lulars que produeixen una disminució de la fertilitat del semen. El paràmetre que ens serveix per determinar l'eficiència de la criopreservació és la motilitat. Els efectes mecànics negatius que es produeixen són deguts a la formació de gel i també per l'efecte osmòtic (collapse cel·lular). També es produeix un dany físic i químic per canvis en la fase dels lípids de membrana i un augment en la peroxidació. Se sap que aquest fenomen està relacionat amb la pèrdua de mobilitat. La majoria dels danys es produeixen durant la descongelació, ja que hi ha una pèrdua de la capacitat antioxidant durant la congelació.

Recentment s'estan desenvolupant mètodes per a la vitrificació de mostres de semen o teixit testicular que, contràriament al que es pensava, es pot dur a terme amb èxit sense la utilització de crioprotectors. Com que el semen no pot tolerar altes concentracions de crioprotector, s'han intentat desenvolupar mètodes de vitrificació amb taxes molt elevades de refredament i escalfament de les mostres amb volums molt petits de mostra.

El mètode de congelació més adequat és

el de perles en gel sec. El semen o teixit, diluït amb el crioprotector, es diposita en els orificis fets prèviament en una peça de gel sec. Les gotes dipositades es congelen en un espai molt curt de temps.

Eficiència

Els factors que estan més relacionats amb les taxes de concepció són: el mètode de criopreservació, la qualitat de la mostra i el tipus de suport utilitzat. Durant la criopreservació es perd al voltant del 50 % de la població inicial d'espermatozoides a causa de l'alteració de la membrana, citosquelet, nucli espermatòtic i aparell motor. Aquests efectes es poden minimitzar amb una preparació adequada de la mostra, la finalitat de la qual és la selecció dels espermatozoides mòbils.

Recentment s'ha demostrat que és possible vitrificar amb èxit el semen sense afegir crioprotectors permeables, submergint la mostra directament en nitrogen líquid.

CRIOPRESERVACIÓ D'EMBRIONS

L'estimulació ovàrica per a l'obtenció d'un gran nombre d'òocits i, conseqüentment, d'embrions, és una pràctica generalitzada en les TRA. Fent referència al registre de la Societat Espanyola de Fertilitat (SEF), en un 20 % del cicles de fecundació *in vitro* (FIV) s'obtenen embrions sobrants per a la criopreservació. S'ha investigat molt en aquest camp, ja que és indiscutible que l'èxit en la congelació de zigots i embrions té uns gran efectes beneficiosos, i possibilita l'augment de les taxes d'embaràs acumulat (transferència d'embrions en fresc més transferències d'embrions descongelats obtinguts en el mateix cicle de FIV). El cost del cicle de criotransferència és $\frac{1}{3}$ del d'un cicle com-

plet de FIV. L'augment de les taxes d'embaràs acumulat està influït per les variables següents: l'eficiència del protocol de congelació/descongelació d'embrions, la qualitat dels embrions congelats i els criteris de selecció dels embrions a criopreservar.

A mitjan anys vuitanta es va generalitzar la criopreservació d'embrions, i això va donar lloc a milers de nens nascuts fins avui dia. El primer naixement a Espanya es va aconseguir quatre anys més tard (Veiga *et al.*, 1987) del primer naixement al món (Trounson *et al.*, 1983). Des de llavors les diferents tècniques han anat evolucionant i han donat lloc lloc a la consecució d'embarassos a partir d'embrions en diferents estadis embrionaris: zigots, embrions primerencs i blastocists. S'han obtingut embarassos a partir dels diferents estadis embrionaris, tant amb la congelació lenta com amb la vitrificació.

Per dur a terme la criopreservació dels embrions és necessari el consentiment dels dos membres de la parella, i han de definir el destí dels embrions criopreservats.

Indicacions

- La preservació per a futures transferències.
- Criopreservació de la totalitat dels embrions pel risc de desenvolupar la síndrome d'hiperestimulació ovàrica (SHO).
- La congelació de la totalitat dels embrions o zigots en programes de donació d'òocits quan no és possible sincronitzar la donant i la receptora.

Eficiència

La criopreservació d'embrions i zigots permet decidir la transferència en fresc d'un nombre adequat d'embrions, i ofereix

al mateix temps 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 obtenir bones taxes d'embaràs acumulat per cicle.

El mètode de fecundació (FIV o ICSI) sembla que no influeix en els resultats de la criotransferència, independentment de l'estadi embrionari.

Zigots

La congelació de pronuclis no és habitual en els centres de reproducció assistida, ja que no permet la selecció morfològica dels millors embrions el dia de la transferència en fresc. A l'Institut Universitari Dexeus la criopreservació de pronuclis es realitza en les donacions d'òocits en les quals no és possible sincronitzar la donant i la receptora. Fent una revisió dels resultats del centre entre els anys 2002 i 2007, les taxes de supervivència se situen en el 86,5 %, amb unes taxes d'embaràs per transferència del 41,7 %. Se situen un 10 % per sota de les taxes d'embaràs en cicles de donació d'òocits, en què la transferència es realitza en fresc (registre SEF 2004). En les transferències de zigots congelats/descongelats és importantíssima l'avaluació dels embrions després del cultiu *overnight*. En el moment de la transferència s'avaluen morfològicament amb els mateixos criteris que es tenen amb embrions en fresc en el D+2.

Embrions primerencs

S'han publicat nombrosos articles (Edgar *et al.*, 2007; Salumets *et al.*, 2006) en els quals s'evidencia la influència de diferents factors embriològics en el potencial d'implantació:

- La qualitat de l'embrió en fresc abans

de la criopreservació. Sobretot el temps i el ritme de divisió i la simetria de les cèl·lules.

— El percentatge de cèl·lules supervivents.

— La reactivació de la mitosi després del cultiu *overnight*.

No s'ha demostrat cap relació entre el dia de desenvolupament (D+2 *vs.* D+3) i les taxes de supervivència o embaràs. En el registre de SEF de 2004 les taxes d'embaràs se situen en el 27,5 %, enfront del 37,3 % dels cicles en fresc.

En una metaanàlisi publicada recentment s'obtenen unes taxes de supervivència embrionària molt superiors amb la vitrificació respecte a la congelació lenta (Loutradi *et al.*, 2008). És necessari realitzar estudis prospectius per poder determinar quin és el millor mètode per a la criopreservació d'embrions primerencs.

Blastocists

Hi ha poca casuística al respecte. Els factors més determinants en la supervivència són l'estadi en el qual es troba el blastocist (inicials, expandits o *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. Actualment està molt generalitzat l'ús de la vitrificació per criopreservar aquests embrions.

Recentment, alguns grups apunten la possibilitat de col·lapsar el blastocist prèviament a la vitrificació per prevenir la formació de gel en la cavitat blastocèlica (Mukaida *et al.*, 2006). Va reportar unes taxes de supervivència de quasi el 90 % i un 45 % d'embaràs per transferència.

La supervivència s'avalua amb un mínim de quatre hores de cultiu per observar si s'ha produït la reexpansió del blastocists. En una publicació recent es comparen els

dos mètodes de criopreservació en blastocists (Liebermann *et al.*, 2006). No troben diferències entre la vitrificació i la congelació lenta en les taxes de supervivència (96,5 % i 92,1 %) ni en les taxes d'embaràs (51,9 % i 53,1 %). Sí que obtenen taxes d'embaràs més elevades transferint blastocist de D+5 enfront dels criopreservats en el D+6, sense que les diferències siguin significatives (31,3 % i 45,4 %).

Els blastocists procedents de cicles de diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) mostren una major sensibilitat al procés de criopreservació. La causa més probable és la manipulació prèvia a la qual s'han sotmès per poder realitzar l'extracció d'un o més blastòmers.

La dificultat d'obtenir embrions genèticament normals i aptes per a la criopreservació en els cicles de DGP fa que sigui de gran importància tenir un bon programa de criopreservació que ens ajudi a augmentar la taxa d'embaràs acumulat.

S'han reportat resultats molt pobres en criopreservació d'embrions biopsiats, tant en estadis primerencs com en estadis de blastocist, mitjançant la tècnica de congelació lenta. En els últims anys s'han obtingut bons resultats aplicant la tècnica de vitrificació. Hi ha poques publicacions sobre vitrificació d'embrions biopsiats. El primer naixement a partir d'un blastocist vitrificat després d'un DGP va ser publicat l'any 2007 (Parriego *et al.*, 2007). Una sèrie més llarga ha estat publicada poc temps més tard, en què es mostren unes taxes de supervivència que romanen baixes, però amb unes taxes d'embaràs per transferència del 44 % (Escribá *et al.*, 2007).

La vitrificació és la tècnica escollida en la majoria de centres, tot i que s'han d'optimitzar els protocols per millorar, sobretot, les taxes de supervivència.

CRIOPRESERVACIÓ D'OÒCITS

L'aplicació clínica de la criopreservació d'oòcits no s'ha generalitzat fins ben entrat el segle XXI, pel baix rendiment que oferien els diferents protocols. Diferents factors han estat claus per centrar l'interès dels científics a millorar la tècnica. D'una banda, les lleis restrictives d'alguns països com Itàlia, on només es permet inseminar un màxim de tres oòcits, amb l'única alternativa de criopreservació dels oòcits restants. D'altra banda, la possibilitat de crear bancs d'oòcits tant per a donació com per a les pacients que tenen compromesa la seva fertilitat (edat, càncer, etc.).

La criopreservació d'oòcits en ratolí es remunta a l'any 1977, any el qual es va poder obtenir descendència sana. No es va aplicar en humans fins a mitjan anys vuitanta. Inicialment la tècnica tenia una baixíssima eficiència. No solament per mancances de la tècnica mateixa: l'enduriment de la zona pellúcida feia que les taxes de fecundació fins a l'aparició de l'ICSI fossin molt baixes. En els primers deu anys, des del primer embaràs el 1986 (Chen *et al.*, 1987), només es van obtenir cinc nens nascuts sans a partir d'oòcits criopreservats.

En els primers anys la tècnica de criopreservació utilitzada era la congelació lenta. El primer naixement amb vitrificació va ser el 1999 (Kuleshova *et al.*, 1999).

Indicacions

— Prèviament a determinats tractaments de malalties oncològiques. Els agents alquilants i la radiació ionitzant poden produir una fallida ovàrica prematura i deixar la pacient estèril. També s'inclouen algunes cirurgies.

— En els casos en els quals la criopreservació d'embrions representa un problema

ètic per a la parella. En aquests casos l'única solució és la inseminació d'un nombre determinat d'oòcits.

— Casos esporàdics en els quals no és possible disposar de la mostra d'esperma en el dia de la punció fol·licular.

— La creació de bancs d'oòcits simplifica en gran mesura els programes de donació i facilita les tasques de selecció de la donant i l'assignació de donant/receptora. També permet garantir i estandarditzar el nombre d'oòcits.

— Dóna la possibilitat de planificar la maternitat posposant-la fins al moment desitjat. Aquesta nova opció permetria conciliar el desig reproductiu amb les necessitats socials. Aquest punt genera debat en la societat actual.

Eficiència

Les característiques de l'oòcit fan que sigui una cèl·lula difícil de criopreservar adequadament. Els oòcits són extremadament fràgils i sensibles a les baixes temperatures a causa d'una mida molt gran, la forma esfèrica (baixa superfície i gran volum), l'alt contingut d'aigua, l'efecte deleteri en les gotes lipídiques, mitocondris i citosquelet, i la presència de la placa meiótica.

El problema de la presència de la placa metafàsica s'ha intentat resoldre criopreservant els oòcits immadurs, però la dificultat està, llavors, en la maduració *in vitro*. Actualment es tendeix a criopreservar els oòcits madurs, en metafase II.

Recentment s'han publicat nombrosos articles amb resultats encoratjadors que han fet que la tècnica es generalitzi com a pràctica clínica habitual, tot i que de moment en cap cas hauria de substituir la criopreservació d'embrions sempre que aquesta sigui possible.

Les dades publicades en els últims anys

mostren que el procés de criopreservació d'òocits és viable, amb el resultat d'un gran nombre de nens sans (> 200) sense que s'ha-gi atribuït cap malaltia derivada de la tècnica.

En l'única metaanàlisi publicada fins al moment (Oktay *et al.*, 2006) queda palès que els resultats en la criopreservació d'òocits encara no són comparables als resultats dels cicles amb òocits en fresc ni amb la criopreservació d'embrions. En la metaanàlisi es compara l'eficiència de la criopreservació d'òocits amb la congelació lenta i la vitrificació. Pel que fa a la congelació lenta, en estudis publicats als EUA les taxes d'implantació presentades mostren un 15,9 %. La taxa d'embaràs per òocit congelat es manté baixa, un 3,2 %. Mitjançant la tècnica de vitrificació els resultats mostren una millora significativa a partir de l'any 2005 a causa d'una sèrie de modificacions que es van introduir en els protocols. La taxa d'implantació va passar del 8,8 % a un 20,5 %, i l'eficiència per òocit vitrificat es va situar en el 6 % (el doble que en la congelació lenta). Hi ha altres revisions que mostren també una eficiència superior en la utilització de la vitrificació enfront dels diferents protocols emprats per la congelació lenta (Gook *et al.*, 2007).

CRIOPRESERVACIÓ DE TEIXIT OVÀRIC

L'estimulació hormonal permet obtenir un nombre elevat d'òocits madurs i augmenta les probabilitats futures d'aconseguir un embaràs. No obstant això, en moltes pacients oncològiques, l'estimulació hormonal pot estar contraindicada, ja que existeixen un gran nombre de tumors dependents d'hormones, o no es disposa del temps suficient per dur-la a terme, ja que hi ha la necessitat d'instaurar el tractament contra el

càncer urgentment. En conseqüència, l'única opció possible en aquests casos seria la criopreservació de teixit ovàric, mentre que la pràctica d'un cicle de fecundació *in vitro* (FIV) amb criopreservació d'òocits queda relegada únicament a pacients sense aquestes limitacions.

L'objectiu de la tècnica és la preservació de la fertilitat en pacients oncològiques, amb malalties autoimmunitàries o per la necessitat d'una cirurgia. Els tractaments antineoplàsics, sobretot els alquilants i la radiació ionitzant, produeixen gonadotoxicitat i donen lloc a una fallada ovàrica prematura. La gonadotoxicitat està relacionada amb l'edat, l'agent terapèutic i la dosi.

Presenta diversos avantatges respecte a la congelació d'òocits:

- Hi ha una gran quantitat de fol·licles primordials en el còrtex ovàric.
- És probable que els fol·licles primordials siguin menys sensibles a la criopreservació, pel seu baix metabolisme.
- En descongelar i reintroduir en el cos de la pacient està demostrada la restauració de la funció endocrina.
- No es depèn del cicle menstrual ni requereix l'estimulació ovàrica.

Metodologia

És una tècnica realitzada amb èxit en diferents models animals, però existeixen resultats molt limitats en humans. La tècnica consisteix en la criopreservació de petits segments del còrtex ovàric per poder-lo descongelar posteriorment i trasplantarlo en el mateix ovari (ortotòpic) o en una altra localització (heterotòpic). La part utilitzada per a la criopreservació és el còrtex, ja que conté un major nombre de fol·licles primordials. Perquè sigui possible l'accés dels crioprotectors al teixit, és important fer tallis fins del còrtex amb una mida de 2 mm

de gruix. Una petita mostra del teixit a criopreservar ha de ser analitzada per un especialista, per detectar la presència de cèl·lules canceroses.

Eficiència

La supervivència del teixit dependrà del procés de criopreservació i també d'una revascularització correcta del teixit un cop trasplantat. Un dels principals problemes és la pèrdua de fol·licles primordials després del trasplantament. Aquesta pèrdua és deguda al procés de congelació/descongelació (al voltant del 7 %) i a la hipòxia pel retard que es produeix fins a la revascularització. En la literatura es fan referència a valors entre el 50 % i més del 90 % (Nisolle *et al.*, 2000), fet que es veu reflectit pels nivells de l'hormona fol·liculoestimulant (alts) i la inhibina B (baixos). La restauració endocrina és de curta durada, i per això s'aconseixa que el trasplantament es faci just en el moment en el qual es tingui desig reproductiu.

Només s'han reportat quatre embarassos a partir de teixit ovàric criopreservat (Oktay *et al.*, 2004). En un dels quatre casos la concepció va ser espontània. A més de la baixa casuística existent, és important tenir en compte el perill potencial que suposa la possible reintroducció de teixit cancerigen en la pacient. Per aquest motiu, també s'estan desenvolupant mètodes de maduració dels oòcits trasplantant el teixit entre espècies (xenotrasplantaments).

BIBLIOGRAFIA

- CHEN, C. (1986). «Pregnancy after human oocyte cryopreservation». *Lancet*, 1: 884-886.
- EDGAR, D.; ARCHER, J.; MCBAIN, J.; BOURNE, H. (2007). «Embryonic factors affecting outcome from single cryopreserved embryo transfer». *Reproductive BioMedicine Online*, 14: 718-723.
- ESCRIBÁ, M. J.; ZULATEGUI, J. F.; GALÁN, A.; MERCADER, A.; REMOHÍ, J.; SANTOS, M. J. DE LOS (2008). «Vitrification of preimplantation genetically diagnosed human blastocysts and its contribution to the cumulative ongoing pregnancy rate per cycle by using a closed device». *Fertil. Steril.*, 89: 840-846.
- FULLER, B.; PAYNTER, S. (2004). «Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine». *Reproductive BioMedicine Online*, 9: 680-691.
- GOOK, D. A.; EDGAR, D. H. (2007). «Human oocyte cryopreservation». *Human Reproduction Update*, 13: 591-605.
- KASAI, M. (2002). «Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultra rapid vitrification». *Reprod. Med. Biol.*, 1: 1-9.
- KASAI, M.; KOMI, J. H.; TAKAKAMO, A.; TSUDERA, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. (1990). «A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability». *J. Reprod. Fertil.*, 89: 91-97.
- 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. (2006). «Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method». *Theriogenology*, 67: 73-80.
- LOUTRAZI, K. E.; KOLIBIANAKIS, E. M.; VENETIS, C. A.; PAPANIKOLAOU, E. G.; PADOS, G.; BONTIS, I.; TARLATZIS, B. C. (2008). «Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis». *Fertil. Steril.*, 90: 186-193.
- LUYET, B. J. (1934). «Working hypotheses on the nature of life». *Biodynamica*, 1: 1-7.
- MAZUR, P. (1984). «Freezing of living cells: mechanisms and implications». *Am. J. Physiol.*, 247: C125-42.
- MAZUR, P.; COLE, K. W.; HALL, J. W.; SCHREUDERS, P. D.; MAHOWALD, A. P. (1992). «Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos». *Science*, 258: 1932-1935.
- NISOLLE, M.; CASANAS-ROUX, F.; QU, J.; MOTTA, P.; DONNEZ, J. (2000). «Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice». *Fertil. Steril.*, 74: 122-129.
- OKTAY, K.; CIL, A. P.; BANG, H. (2006). «Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis». *Fertil. Steril.*, 86: 70-80.
- OKTAY, K.; TILLY, J. (2004). «Livebirth after cryopre-

- served ovarian tissue autotransplantation». *Lancet*, 364: 2091-2092.
- PARRIEGO, M.; SOLÉ, M.; AURELL, R.; BARRI, P. N.; VEIGA A. (2007). «Birth after transfer of frozen-thawed vitrified biopsied blastocysts». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 24: 147-149.
- PEGG, D. E. (1987). «Mechanisms of freezing damage». *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 41: 363-378.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. (1949). «Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures». *Nature*, 164: 666.
- SALUMETS, A.; SUIKKARI, A. M.; MÄKINEN, S.; KARRO, H.; ROOS, A.; TUURI, T. (2006). «Frozen embryo transfers: implications of clinical and embryological factors on the pregnancy outcome». *Human Reproduction*, 21: 2368-2374.
- SHAW, J. M.; JONES, G. M. (2003). «Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos». *Human Reproduction Update*, 9: 583-605.
- SHERMAN, J. K.; BUNGER, R. G. (1953). «Observations on preservation of human spermatozoa at low temperatures». *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82: 686-688.
- TROUNSON, A.; MOHR, L. (1983). «Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo». *Nature*, 305: 707-709.
- TUCKER, M. J.; LIEBERMANN, J. (2007). *Vitrification in assisted reproduction*. Londres: Informa Healthcare.
- US DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES (1999). *Laboratory biosafety manual*. 4a ed. Washington: National Institute of Health.
- VATJA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. (1998). «Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos». *Mol. Reprod. Dev.*, 51: 53-58.
- VATJA, G.; NAGY, Z. P. (2006). «Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification». *Reproductive BioMedicine Online*, 12: 779-796.
- VEIGA, A.; CALDERON, G.; BARRI, P. N.; COROLEU, B. (1987) «Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with less than 50% intact blastomeres». *Human Reproduction*, 2: 321-323.
- WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. (1972). «Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C». *Science*, 178: 411-414.
- WILMUT, I. (1972). «The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing». *Life Sci. I. I.*, 11: 1071-1079.
- WOODRUFF, T. K.; SNYDER, K. A. (2007). *Oncofertility, fertility preservation for cancer survivors*. Nova York: Springer.
- ZEILMAKER, G. H.; ALBERDA, A. T.; GENT, I. VAN; RIJCKMANS, C. M.; DROGENDIJK, A. C. (1984). «Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos». *Fertil. Steril.*, 42: 293-296.