

ASPECTES TEÒRICS DE LA CONGELACIÓ DE GÀMETES I D'EMBRIONS

MARK GROSSMANN I JOSEP SANTALÓ

Unitat de Biologia Cel·lular. Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia. Universitat Autònoma de Barcelona

RESUM

Les tècniques de congelació de gàmetes i d'embrions tenen interès en el marc de l'establiment de bancs d'embrions genèticament caracteritzats i aptes per a ésser transferits.

En aquest treball revisem, en primer lloc, la teoria de la congelació entesa com els principis generals de la criopreservació i els models matemàtics que descriuen els efectes negatius de la congelació sobre el material biològic; i en segon lloc, les estratègies de congelació de gàmetes i d'embrions més habituals actualment i els crioprotectors més àmpliament emprats per a la criopreservació.

ABSTRACT

The development of preimplantation diagnosis of embryos before transfer arose the interest for new methods of cryopreservation.

First, we review the theoretical aspects of the cryopreservation principles and the mathematical models which describe the detrimental effect of freezing and thawing procedures.

Second, we comment the foremost freezing techniques used nowadays in embryo cryopreservation and the most successful crioprotectants add to the freezing-thawing media.

INTRODUCCIÓ

Tret de notables i ben comptades excepcions, un alt percentatge de cèl·lules animals i vegetals queden alterades morfològicament o bé són incapaces de reempendre les divisions en cultiu, quan se les sotmet a processos de congelació a molt baixes temperatures i a la posterior descongelació.

No obstant això, hi ha algunes espècies que han desenvolupat sistemes per a sobreviure en condicions de fred extrem. Aquest fet *per se* demostra que temperatures per sota dels zero graus no són incompatibles amb el manteniment de la vida.

D'ençà dels anys trenta la recerca centrada a reduir les pèrdues de material biològic viu durant la congelació/descongelació ha anat prenent força a mesura que s'anaven perfilant noves aplicacions de la criopreservació.

Avui hi ha un ampli ventall de disciplines que incorporen protocols de congelació en els seus dissenys experimentals. En el camp concret de la investigació sobre reproducció, el manteniment de bancs de cèl·lules criopreservades permet emmagatzemar oòcits, espermatozoides, i embrions tant genèticament caracteritzats com no, de manera que es millora el rediment de la selecció artificial exercida sobre les soques animals amb interès bé econòmic o bé científic d'una banda, i de l'altra s'assisteix les tècniques de fecundació *in vitro* (FIV) en alguns dels casos d'infertilitat humana.

HISTÒRIA

Des de molt antic ha despertat curiositat la relació de la vida amb el fred.

A les darreries del segle XVIII Spallanzani

(20) investigà l'efecte d'«el fred i de la neu hivernal» en els espermatozoides i en la morfologia dels ous del cuc de la seda. Ell escollí aquest material atenent que els espermatozoides presenten una motilitat ben definida i coneguda, i en el cas dels ous atenent al fet que llur grandària li permetia fer observacions directes. Després de refredar-los a temperatures properes als -7°C i de tornar-los a escalfar observà que els espermatozoides encara romanien mòbils, i en conseqüència va concloure que havien suportat els procés de refredament.

De totes maneres, la criopreservació en sentit estricte (entesa com l'emmagatzematge a molt baixes temperatures de cèl·lules i teixits en estat viable), no pren forma fins a mitjans d'aquesta centúria. Hom assenyala com a primers estudis en criopreservació els treballs desenvolupats per Luyet i col·l. els anys trenta (9 i 10), i els dels equips de Chang (1) i de Polgue (15) els anys quaranta. És precisament Polgue qui per primera vegada descriu les propietats dels crioprotectors afegits als medis de congelació.

La recerca sobre les possibilitats de la criopreservació aplicada a la rutina hospitalària va rebre un fort impuls durant els anys cinquanta arran de l'interès de l'*American Red Cross* en la congelació d'alguns teixits humans, i sobretot de les cèl·lules i els components sanguinis. D'aquests estudis, se n'obtingueren dades no directament relacionades amb els processos de millora dels protocols de congelació, però sí de relacionades amb els danys cel·lulars que d'ells se'n derivaven (8 i 13).

L'any 1963 Mazur (11) publicà, precisament basant-se en estudis de congelació de cèl·lules sanguínies, les primeres equacions de cinètica de la deshidratació cel·lular intrínseca de la congelació.

A banda de tots aquests treballs inicials, la

majoria d'autors accepten com a pioners en criopreservació d'embrions:

a) Els estudis sobre congelació d'embrions de ratolí publicats l'any 1972 per dos equips diferents, el de Wilmut (23) per un costat i el de Whittingham (22) per l'altre.

b) La recerca d'Edwards i Steptoe en 1977 (3) sobre la congelació d'embrions humans, i

c) Les dades, ja més recentment, de Rall i Fanhy (1985) pel que fa a la vitrificació (18).

PRINCIPIIS DE LA CRIOPRESERVACIÓ

Efectes directes de la disminució de la temperatura sobre l'aigua

En refredar cèl·lules i teixits cel·lulars molt per sota del punt de congelació dels medis que els mantenen es produeixen tota una sèrie de canvis, tant biològics com físico-químics, que difícilment es poden individualitzar, car els uns són la causa o l'efecte dels altres.

Una primera aproximació purament intuïtiva a aquestes modificacions planteja que el refredament de les mostres biològiques ha de tenir efectes sobre l'estructura de l'aigua.

L'aigua no solament constitueix entre un 70 i un 90 % del pes de les formes vives, ans integra la fase on es desenvolupa la vida. Presenta elevats punts de fusió i d'ebullició, i unes calors de fusió i de vaporització més altes que les de la majoria dels líquids. Aquestes dades indiquen una cohesió interna de l'aigua líquida relativament alta.

Es pot considerar que àdhuc a temperatura ambient l'aigua és una barreja entre molècules estructurades en forma tetraèdrica (grups de cinc molècules: una en cada un dels vèrtexs del tetraèdre i una al centre) i molècules lliures. A

mesura que la temperatura disminueix s'incrementa la proporció de molècules d'aigua ordenades.

Amb aquest comportament, l'aigua respon al refredament d'una manera ben singular: augmenta el volum i redueix la seva densitat. Aquest augment de volum, aquest inesperat comportament que, d'altra banda, és clau per al manteniment de la vida en les regions fredes del planeta Terra, també és una de les causes més importants de mort cel·lular durant la congelació/descongelació, ja que la formació de gel dins de les cèl·lules mena a la seva destrucció, bé sigui per l'estrès osmòtic derivat de la formació del gel, per l'estrès mecànic fruit de l'avançament del front de gel, bé sigui per la combinació d'ambdós factors.

En conseqüència, com que la congelació de material biològic es realitza, en la majoria dels casos, en solucions aquoses de diversos soluts, l'èxit de la criopreservació depèn de l'adequada deshidratació cel·lular, a fi de prevenir així la formació de gel intracel·lular.

Refredar una solució aquosa que contingui cèl·lules implica que el pas a l'estat solidificat no es produirà abans dels -10°C , en part a causa de l'efecte dels soluts que conté el medi, i en part per l'efecte de sobrefredament (del qual parlarem més endavant). De totes maneres, entre les temperatures de -5°C i la de -10°C ja es detecta la formació de gel en el medi i es produeix la coexistència de les fases líquida i sòlida de l'aigua.

El procés de solidificació té clarament dues etapes ben diferenciades: la fase de nucleació o de generació de punts de cristallització, i la fase de creixement o d'extensió dels fronts de solidificació.

Els centres de nucleació apareixen segons una distribució al·leatòria si s'acompleix la condició que el volum aquós sigui comple-

tament homogeni. A la pràctica, aquesta condició no es pot complir, ja que qualsevol medi de congelació incorpora partícules en suspensió; això a banda de les pròpies cèl·lules, de les imperfeccions en les parets del contenidor, i que la superfície de la fase aquosa és, ella mateixa, una imperfecció insalvable.

La nucleació s'inicia principalment en el medi extracel·lular i s'estén a través d'aquest medi. La coexistència d'aigua líquida intracel·lular amb el medi extracel·lular gelat només s'entén per la presència de les barreres constituïdes per les membranes plasmàtiques de les cèl·lules en suspensió.

A partir d'aquesta situació, les cèl·lules han de perdre aigua, s'han de deshidratar per mantenir l'equilibri osmòtic amb un medi exterior cada vegada més hipertònic a causa de la creixent formació de gel.

Si la taxa de refredament escollida per a la congelació és massa ràpida aquest equilibri no es pot assolir, de manera que queda massa aigua a l'interior de les cèl·lules, fet que comporta la formació de gel intracel·lular, fenomen íntimament vinculat amb la mort cel·lular. Si la taxa de refredament és massa lenta, s'allarga la deshidratació fins al col·lapse cel·lular, també letal.

Amb taxes de refredament adequades per a cada tipus de cèl·lules es manté un equilibri entre la velocitat de deshidratació i la disminució de la temperatura.

Hi ha tres paràmetres que marcadament influencien aquest flux d'aigua intra↔extra-cel·lular:

1. (Lp) la permeabilitat de la membrana plasmàtica a l'aigua.
2. (A/V) la raó entre la superfície cel·lular i el volum cel·lular.
3. (E) l'energia d'activació.

Hi ha una estreta relació entre les velocitats de refredament i aquests tres paràmetres. En

conseqüència, la taxa màxima de refredament varia àmpliament en funció de la composició de la membrana de cada tipus cel·lular i de la relació superfície/volum cel·lular.

Tipus cel·lulars amb membranes força permeables presenten fluxs de sortida d'aigua més ràpids i, consegüentment, suporten refredaments més ràpids; mentre que cèl·lules de gran volum (com és el cas dels oòcits i embrions) requereixen taxes lentes de refredament perquè llur superfície d'intercanvi respecte del volum és menor que en el cas de tipus cel·lulars de morfologia més aplanada (p. e., els eritròcits).

D'altra banda, la disminució de la temperatura té efectes immediats sobre l'activitat enzimàtica, sobre les propietats de les membranes i sobre components termosensibles del citosquelet.

Efectes directes de la disminució de la temperatura sobre l'activitat enzimàtica

Hi ha una forta disminució de l'activitat enzimàtica (el descens és de l'ordre de vuit vegades en abaixar la temperatura de 37 °C a 7°C). Això, òbviament, afecta tant l'activitat enzimàtica com, en la membrana, el transport actiu o la difusió facilitada. Ara bé, en aquest efecte rau també l'interès de la criopreservació: a temperatures inferiors a -60 °C pràcticament no hi ha cap mena d'activitat molecular, i a les temperatures d'emmagatzematge en nitrogen líquid (-196°C) tota forma d'activitat bioquímica s'ha aturat, de manera que no hi pot haver modificació del DNA, igual que no hi ha activitat sintètica, ni activitat degradativa, ni activitat reparadora... Hom assenyala que la criopreservació és capaç de mantenir el material biològic congelat invariable indefinidament,

encara que només fa uns quaranta anys que es mantenen mostres criopreservades.

Les úniques alteracions que a temperatures al voltant de -196°C podrien afectar el material congelat haurien, doncs, de provenir de l'exterior. Per exemple, hom contempla la ionització per reaccions fotofísiques fruit de les radiacions ambientals rebudes durant el temps d'emmagatzematge; ionitzacions que, en absència dels mecanismes de reparació, s'anirien acumulant. Però embrions de ratolí sotmesos a radiació en una dosi equiparable a mil anys d'exposició natural no presenten reducció en llur nivell de supervivència postdescongelació, i tampoc no presenten un augment d'anomalies cromosòmiques (5).

Efectes directes de la disminució de la temperatura sobre l'estructura de la membrana

La naturalesa dels àcids grassos i llur grau d'insaturació defineixen, per a les membranes, punts de fusió relativament baixos. Així, la transició de lípids fluids a sòlids es presenta a temperatures entre 10 i 16°C i provoca alteracions que afecten totes les funcions de les membranes, àdhuc el pas d'aigua. A més a més, el pas de la disposició en mosaic fluid a una disposició sòlida confereix a la membrana un alt grau de fragilitat, de manera que es perd una de les propietats més característiques de la membrana, com és la seva versatilitat a l'hora de respondre als canvis de volum cel·lular. Les alteracions de la fase lipídica en la membrana plasmàtica intervenen en el fenomen de xoc tèrmic (14) i, en el cas dels embrions de porc, semblen les responsables de la pèrdua de viabilitat típicament observada per a aquesta espècie durant la congelació.

Efectes directes de la disminució de la temperatura sobre el citoesquelet

Una part important dels components del citoesquelet la integren els microtúbuls, agregacions bàsicament de tubulines, que se sap que són termosensibles. Els microtúbuls semblen tenir, entre altres funcions, la responsabilitat de l'establiment i el manteniment de la polaritat cel·lular i la configuració de nombroses associacions intracel·lulars, tant entre orgànuls com amb microfilaments i filaments d'actina. A més a més els microtúbuls estructuren el fus acromàtic de la placa metafàsica.

Sotmesos a processos de refredament per sota de 4°C els microtúbuls es desestructuren. Això significa que durant la congelació el citoesquelet es veu seriosament afectat en la seva organització bàsica, i que un cop descongelades, les cèl·lules han de reconstruir aquesta part de llur arquitectura.

Aquesta sensibilitat dels microtúbuls al refredament podria tenir una gran importància en tractar de congelar cèl·lules que es troben en metafase, pel seu possible efecte sobre el repartiment cromosòmic posterior a la divisió (com és el cas dels oòcits de mamífer, aturats en la metafase II). Curiosament, però, no s'ha observat un augment significatiu de les anomalies cromosòmiques en els embrions obtinguts d'oòcits congelats (5).

Ultra aquests efectes directes de la disminució de la temperatura sobre l'aigua i l'activitat enzimàtica, el refredament comporta modificacions en les relacions de l'aigua amb els components cel·lulars, i també canvis dràstics en la concentració de soluts i en la concentració de gasos dissolts.

Efectes indirectes de la disminució de la temperatura sobre la relació de les molècules biològiques amb l'aigua

Totes les molècules que conformen les cèl·lules adopten llurestructura activa en funció de les relacions que estableixen amb l'aigua líquida. Així per exemple, les proteïnes defineixen llurestructura terciària i quaternària en relació íntima amb l'aigua, igual com els lípids de membrana orienten llurs polaritats i posicions hidrofòbiques en funció de l'aigua veïna. En congelar, just en la fase de transició líquid-sòlid, cada cop hi ha menys aigua líquida per a mantenir les interrelacions amb les molècules biològiques, ja que cada vegada hi ha més gel. A més a més les interrelacions queden afeblides de manera que a 0°C la intensitat de la interacció aigua-proteïnes mitjançant ponts d'hidrogen és molt dèbil, mentre que a -60°C pràcticament no es detecta.

S'entén doncs que la congelació no només implica canvis a l'estructura física de l'aigua, ans influeix fortament en l'estructuració de la majoria, per no dir de la pràctica totalitat dels components cel·lulars.

Efectes indirectes de la disminució de la temperatura sobre la solubilitat dels gasos

La solubilitat dels gasos en aigua queda descrita per la llei de Henry: la concentració d'un gas en una solució donada està regida no només per la seva pressió de vapor, sinó també pel seu coeficient de solubilitat. Això té sentit perquè alguns tipus de molècules són atretes físicament o química per les molècules d'aigua. Òbviament, si son atretes poden dissoldre's molt més sense causar una excessiva pressió

dins de la solució, mentre que les molècules que siguin repel·lides presentaran un baix grau de solubilitat.

La llei de Henry expressa matemàticament aquesta situació:

concentració de gas dissolt = pressió x coeficient de solubilitat

Per tant, a grans trets, la solubilitat augmenta en refredar-se la solució dissolvent. En criobiologia té gran importància la solubilitat (o coeficient d'absorció) per al CO₂, ja que aquest augmenta fortament en refredar els medis de congelació, de manera que un medi refredat pot arribar a contenir dissolt més del doble de CO₂ del que inicialment contenia a 25 °C.

Aquest increment és molt superior als valors corresponents per als coeficients del O₂ i el N₂.

TAULA I

Constant de la llei de Henry de diversos gasos en funció de temperatura

Gas	K = (mol/l)/ atm	
	a 25 °C	a 0 °C
CO ₂	0,03400	0,07700
O ₂	0,00130	0,00252
N ₂	0,00068	0,00103

La importància d'aquest increment en la solubilitat sobretot del CO₂ s'emmarca en la composició de la majoria dels medis, els quals basen llur estabilitat en l'acció tamponadora dels sistema HCO₃⁻ ↔ CO₂. Un augment tant fort de la concentració de CO₂ desplaça el rang del pH cap a valors marcadament àcids.

Sobrefredament

En un procés programat de congelació, el medi es refreda força lentament i estàtica, per la qual cosa presenta efectes de sobrefredament per manca de centres de nucleació que indueixin la formació del gel. Per aquesta raó, a valors al voltant de -10°C encara no s'ha produït la formació de gel, malgrat allò que seria esperable.

L'aigua intracel·lular sobrefredada té, per definició, un potencial químic més gran que l'aigua parcialment congelada del medi extern. Com a conseqüència d'aquesta diferència de potencials, l'aigua intracel·lular flueix cap enfora i congela extracel·lularment.

Quan comença la formació de gel, l'aigua que es glaça allibera la calor latent de solidificació (al voltant de 79 cal/g). En condicions de sobrefredament, aquesta energia alliberada produeix un escalfament del medi de congelació fins a temperatures properes a 0°C independentment de la taxa de refredament programada (vegeu la fig. 1). Com que el programa de congelació manté la pauta de refredament pre/establerta, la mostra tot seguit es refreda, ja que la temperatura de la cambra de congelació ha anat descendint seguint el programa, i en aquest punt es troba bastant per sota de la temperatura de la mostra. Aquest refredament descontrolat de la mostra es duu a terme a velocitats molt més altes de les previstes i tolerades per les cèl·lules.

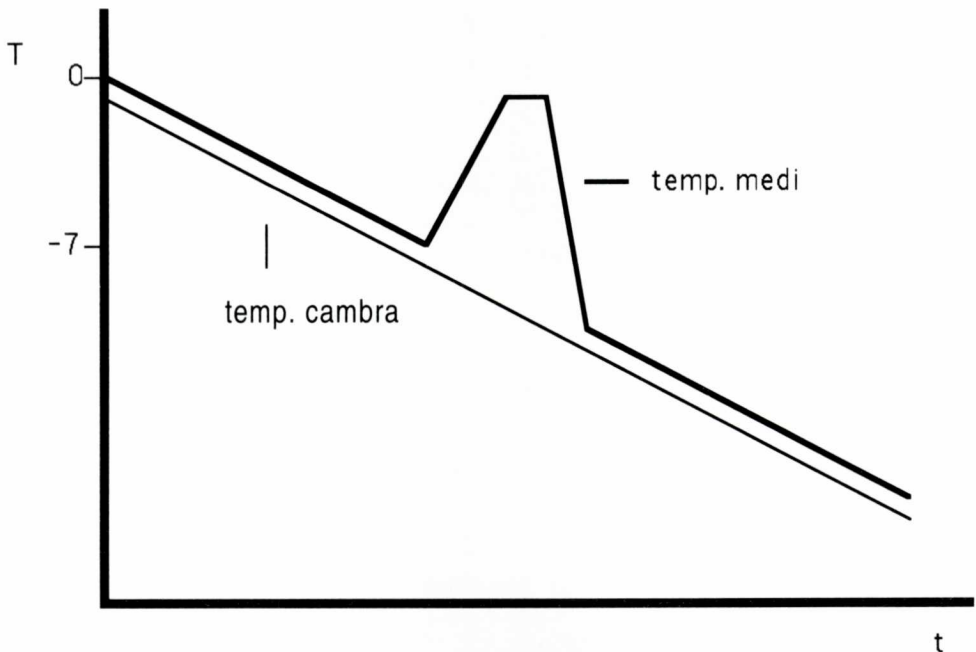


FIGURA 1. Efecte de l'alliberament de la calor latent de l'aigua sobre la temperatura de la mostra en congelar-se el medi. (T, en $^{\circ}\text{C}$)

MODELS MATEMÀTICS DELS PROCESSOS DE CONGELACIÓ

Equacions de Mazur

El model teòric que defineix els processos de congelació fou presentat per Mazur l'any 1963 (11), i reajustat per ell mateix l'any 1977 (12). Es tracta d'un model basat sobretot en dos paràmetres: la permeabilitat de l'aigua i la taxa de refredament, i queda descrit en quatre equacions:

$$dV/dt = L_p A (P_i - P_e) \quad (1)$$

o bé l'equació menys simplificada,

$$dV/dt = (L_p A R T \ln(p_i/p_e)/v^o)$$

L'aigua es mou a través de les membranes cel·lulars segons el gradient de pressió osmòtica. Breument, el volum cel·lular (dV) varia segons el temps (dt) atenent la conductivitat hidràulica (L_p) de la membrana, l'àrea de superfície de membrana (A), i el gradient de pressió osmòtica ($P_i - P_e$).

Obé segons la conductivitat hidràulica (L_p) de la membrana, l'àrea de superfície de membrana (A), la constant dels gasos perfectes (R), la temperatura a cada moment (T) i la relació intracel·lular/extracel·lular de la pressió de vapor (p_i i p_e , respectivament); i és inversament proporcional al volum molar de l'aigua (v^o).

$$dL_p(p_e/p_i) dt = L_i/RT^2 - [N_2 v^o / (V + N_2 v^o) V] dV/dt \quad (2)$$

Aquesta segona equació defineix els canvis en la relació de pressions de vapor en disminuir la temperatura. L_i és la calor latent de fusió del gel i N_2 representa osmols de soluts intracel·lulars.

$$dT/dt = B \quad (3)$$

Aquesta tercera equació marca la taxa constant de refredament.

$$L_p = L_p \exp [-E/R (1/T - 1/T_g)] \quad (4)$$

Finalment, es relacionen els canvis de conductivitat hidràulica referits a un coeficient de temperatura (on T_g és la temperatura coneguda. E és l'energia i R la constant dels gasos perfectes).

Treballant amb aquestes quatre equacions es pot calcular la pèrdua teòrica d'aigua soferta per una cèl·lula hipotètica durant el procés de refredament a diferents velocitats.

Per tal d'evitar la formació de gel intracel·lular, abans d'arribar a la temperatura de nucleació del gel intracel·lular s'ha d'assolir un equilibri en l'aigua que conté cada cèl·lula, equilibri descrit segons l'equació:

$$V = v^o M_i / [\exp (L_i/RT - L_i/R273) - 1]$$

on M_i és l'osmolalitat inicial de la solució.

ESTRATÈGIES DE LA CRIOPRESERVACIÓ

Consideracions prèvies a l'hora d'establir un protocol de congelació

Intentar reduir els efectes negatius dels processos de congelació/descongelació passa per dues fases: d'una banda, s'ha de valorar el material biològic que es vol congelar, de quina manera aquest respondrà al refredament i sospesar de quin utilitatge de laboratoris disposa. De l'altra banda, cal determinar quin mètode de congelació se segueix, amb quines taxes de refredament i quins agents criopreservadors.

Tipus de cèl·lules

En funció de la conductivitat hidràulica (L_p) i la relació volum/àrea de superfície

relacionades per a la congelació en les equacions de Mazur, es veu clar que els processos de congelació han d'ésser ben diferents atenent a la morfologia de cada tipus cel·lular i la seva composició de membrana. A més a més, hi ha un altre paràmetre extern afegit, com és el de l'interès del material biològic que es desitja congelar. Segons el valor d'allò que es congeli, hom pot tolerar un grau més o menys alt de pèrdues.

Com a regla general, cèl·lules de morfologia aplanada o material biològic del qual es disposi en gran quantitat, i per tant no sigui especialment

valuós, suporten velocitats de refredament molt més ràpides que cèl·lules de morfologia esfèrica, voluminosa, o bé material escàs, i per tant d'interès elevat.

exemples de rampes de congelació

1r: Protocol de congelació per a cèl·lules de morfologia aplanada i molta superfície d'intercanvi amb el medi extracel·lular (p.e. bacteris, fibroblasts, eritròcits, etc.) (vegeu la fig.2).

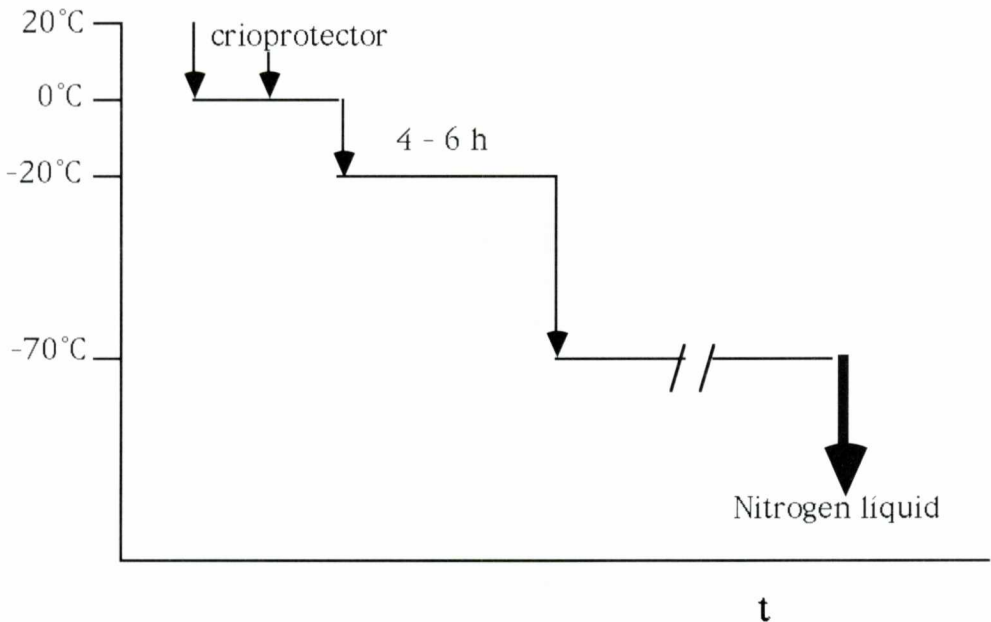


FIGURA 2. Protocol de congelació de fibroblasts.

Es tracta d'un protocol ràpid. Refredar la suspensió cel·lular fins a 0 °C i afegir el crioprotector. Portar i mantenir durant 4-6 h a -20 °C. Refredar a -80 °C (a aquesta temperatura el material hi pot restar emmagatzemat fins a un any). Submergir en nitrogen líquid (N₂L).

La descongelaació és ràpida, i s'aconsegueix col·locant els contenidors amb el material congelat en banys d'aigua pre-escalfada.

2n: Protocol característic per a la congelació d'espermatozoides (vegeu la fig. 3).

Afegir el crioprotector a temperatura ambient i refredar a raó d'1 °C/min fins a la

temperatura de -7 °C. Inducció de la formació de gel (*seeding*). Refredar a la mateixa taxa fins a la temperatura intermèdia de -50 °C. Submergir en N₂L.

La descongelaació es fa lentament, deixant els contenidors a temperatura ambient.

3r: Protocol de congelació elaborada i de llarga durada en temps, útil per a la criopreservació de cèl·lules de gran volum com ara oòcits o embrions, cèl·lules que necessiten amplis marges de temps per a assolir els equilibris. A més a més es tracta de material escàs, i per tant, valuós (vegeu la fig. 4).

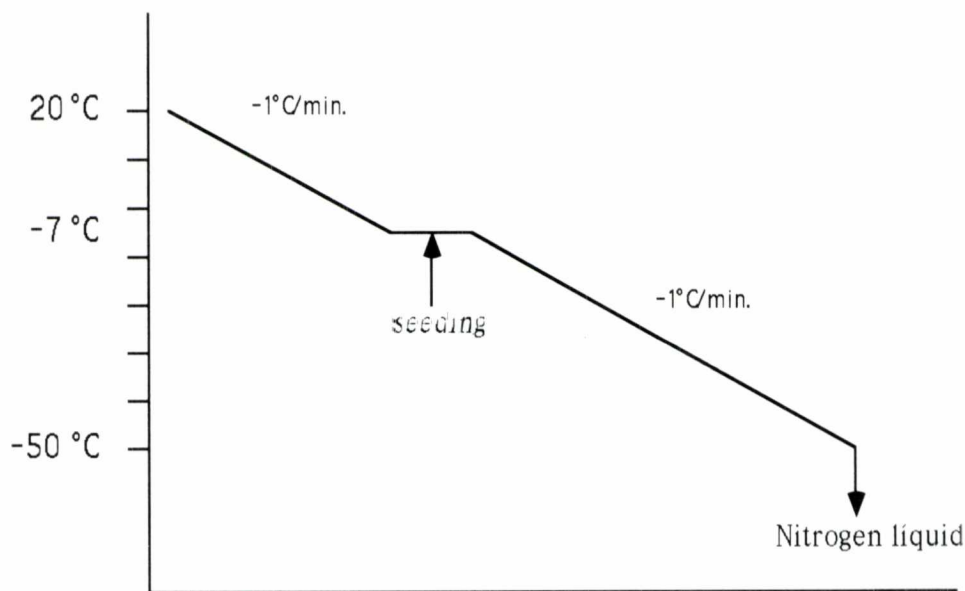


FIGURA 3. Protocol de congelació d'espermatozoides.

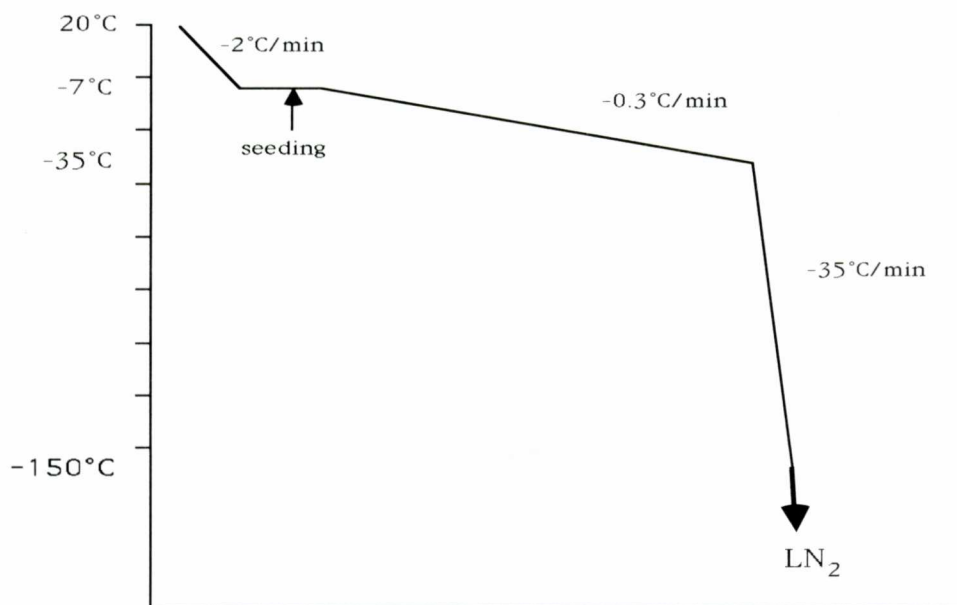


FIGURA 4. Protocol de congelació d'embrions.

Afegir a la temperatura ambient el crioprotector en un o diversos passos. Refredar fins a -7°C , a raó de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Induir el *seeding*. Refredar lentament fins a una temperatura intermèdia de -30°C a raó de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ i ràpidament fins a la temperatura de -150°C . Submergir en N_2L .

Descongelació molt ràpida al bany de 30°C .

Contenidors

Evidentment el medi de congelació amb les cèl·lules es troba dins d'un contenidor hermèticament tancat, de manera que no hi ha cap mena d'intercanvi amb el N_2L del banc d'emmagatzematge. Aquest fet representa un barrera a la difusió de la calor, i en conseqüència,

també una distorsió en la propagació del refredament.

Hi ha dos tipus de contenidors segons la quantitat de material que admeten.

Els contenidors de volum petit són les palletes de plàstic (poliestirè). Encara que aquesta mena de plàstic no és un excel·lent conductor tèrmic, com que el volum és petit, pràcticament no es detecten diferències de temperatura entre l'ambient extern i l'intern.

Presenten l'avantatge que permeten carregar dues o més solucions diferents en una mateixa palleta, senzillament separades per bombolles d'aire, les quals a la vegada compensen els processos de dilatació típics de l'aigua en refredar-se. A l'hora d'emmagatzemar les mostres en un banc, les palletes de congelació són molt més fàcilment

transportables, difícilment exploten i en caben moltes més. Ultra tot això, la inducció del *seeding* es fa en una gota de medi on no hi ha cèl·lules, de manera que no es poden produir danys cel·lulars per aquesta causa, i a més a més, la inducció de la formació de gel es pot realitzar d'una manera automatitzada. Com a desavantatge cal assenyalar que es tracta de contenidors molt sensibles als canvis de temperatura exterior, de manera que es poden descongelar si no es treballa amb precaució.

Els contenidors de volum gran poden ésser ampolletes de vidre o bé criotubs de plàstic. El vidre és millor conductor tèrmic, però és més car i pot explotar amb una certa facilitat en ésser escalfat ràpidament durant la descongelació. Per la seva banda, els criotubs que no queden massa plens, i per tant tanquen una gran bombolla d'aire, poden surar en el N_2L també amb una certa facilitat.

Ambdós tipus de contenidors només admeten la càrrega d'una sola mena de material, i a l'hora d'induir la formació de gel, si en la regió propera a la inducció hi ha cèl·lules, aquestes amb tota probabilitat resultaran irreversiblement afectades. Usualment, aquest tipus de contenidors requereixen *seeding* manuals.

Aparells de congelació

Hi ha tres aparells per a procedir al refredament de les mostres. Atenent una gradació en llur eficàcia a l'hora de controlar les taxes de refredament, hom cita:

1. Cambres de Dewar o banys en fred. Els contenidors amb les mostres es troben submergits en alcohol en un recipient que a la seva vegada s'introdueix més o menys en N_2L , segons les taxes de refredament que es desitgin

a cada moment. És apropiat per a refredament lents perquè la transmissió del refredament és lenta.

2. Sistemes oberts de congelació. Consisteixen en un recipient amb N_2L i un programador que controla la distància des de la superfície del N_2L a la qual es posa la mostra. Com més de pressa es desitgi fer un refredament més a prop de la superfície, és a dir, més immersa en els vapors de N_2L haurà d'estar la mostra. És apropiat tant per a congelacions lentes com per a congelacions ràpides i àdhuc per a vitrificació.

3. Congeladors biològics programables. Consisteixen en una cambra tancada, amb la temperatura interior controlada per un ordinador que regula la taxa de refredament obrint o tancant el pas de N_2L . Dins, un ventilador en constant funcionament s'encarrega d'homogeneïtzar el flux de fred. És l'únic sistema que incorpora l'inductor automàtic de *seeding*. És apropiat per a congelacions lentes i precises.

CONGELACIÓ

Factors que provoquen la mort cel·lular

Fonamentalment, hi ha tres factors que provoquen la mort cel·lular durant els processos de congelació i descongelació:

1. Increment de la concentració dels electròlits tant en l'interior de les cèl·lules com en el medi de congelació; és a dir, xocs osmòtics soferts per les cèl·lules.

2. Formació de cristalls intracel·lulars de gel.

3. Modificacions de les interaccions aigua-molècules biològiques.

Factors que milloren les taxes de supervivència

D'aquests tres factors, actualment només podem incidir sobre els dos primers, perquè no podem influir sobre les modificacions que durant la congelació i la descongelació experimenten les interaccions entre l'aigua i la resta de les molècules biològiques.

Consegüentment, els dos potents factors negatius que sí que es poden compensar són els efectes citotòxics de l'exposició excessiva a altes concentracions salines i la formació de cristalls intracel·lulars.

En aquesta línia, hom aconsegueix reduir l'increment de la pressió osmòtica, és a dir, l'increment de la concentració dels electròlits, mitjançant l'addició d'agents crioprotectors al medi de congelació; mentre que per a evitar la formació de cristallitzacions intracel·lulars cal establir les taxes adequades de refredament. Si les taxes de refredament són lentes, es fa necessària la inducció de la formació de gel com a estratègia per a reduir els efectes del sobrefredament.

Utilització de crioprotectors

L'any 1949 Polgue i col·l. (15) descobriren les propietats crioprotectors del glicerol en intentar millorar l'eficàcia de la congelació d'espermatozoides. D'aleshores ençà, altres molècules s'han afegit a la llista de crioprotectors.

Actualment tots els programes de congelació preveuen l'addició al medi de congelació de

crioprotectors permeables, i sovint també de sacarosa.

No es coneix l'acció exacta a través de la qual els crioprotectors provoquen un increment de la supervivència cel·lular. Empíricament s'ha detectat que, afegits al medi de congelació, produeixen una disminució del punt de congelació i una disminució del punt eutèctic.

Per *eutèxia* s'entén el fenomen que apareix en el canvi de fases d'alguns sistemes binaris en els quals, per a una o més proporcions determinades dels components, el sistema es comporta com un element pur de solidificació, és a dir, com un sol compost sòlid, en comptes de separar-se'n tots dos components. En un diagrama de fases per al procés de refredament d'una solució, el punt eutèctic reflecteix el màxim de concentració de soluts que s'assolix just abans que aigua i soluts es solidifiquin conjuntament.

Inicialment, el material biològic es troba immers en un medi de congelació que bàsicament consisteix en una solució salina isotònica (vegeu la fig. 5). Primerament, hi ha el procés de refredament des de la temperatura ambient inicial (A) fins al punt de congelació de la solució isotònica. Si no hi ha sobrefredament en aquest punt, es forma gel (B). Com que el procés de refredament continua (rampa C), es forma més gel i, en conseqüència, la concentració de sals augmenta fortament. A tall d'exemple, per a una solució de NaCl, s'assoleix el punt eutèctic a 21 °C aproximadament, independentment de quina sigui la concentració de sals i la temperatura inicials. En aquest moment, la concentració salina és màxima (D) i tot el sistema es solidifica en una proporció constant de gel i sal (barreja eutèctica).

La disminució del punt eutèctic induïda pel crioprotector comporta que la concentració de

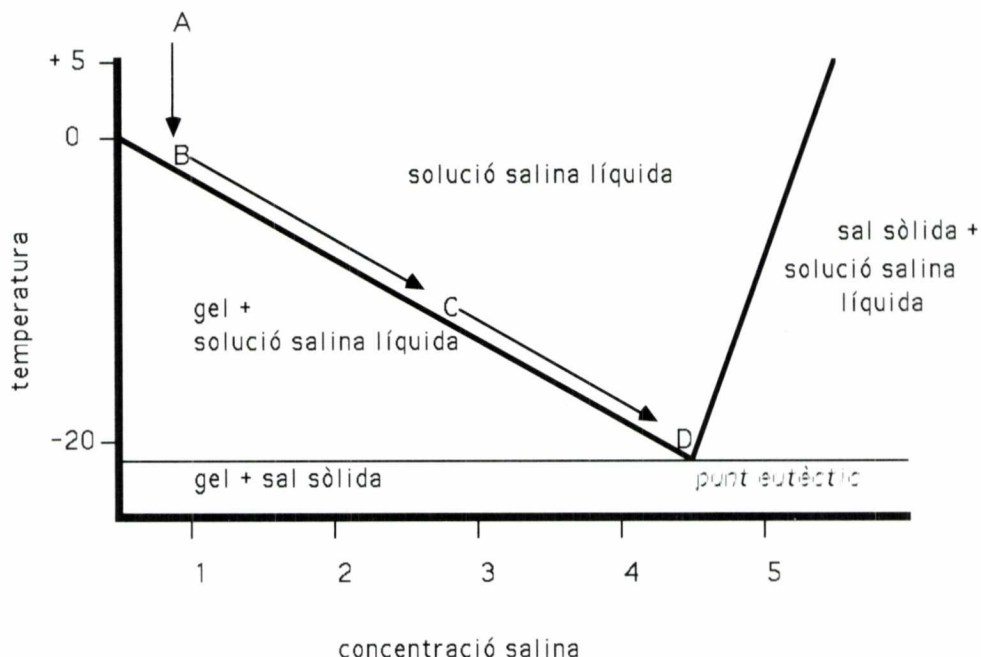


FIGURA 5. Diagrama de fases per al procés de congelació d'una solució salina (temperatura en °C).

sals donada a una temperatura determinada sigui menor, o expressat d'una altra manera, que una concentració donada s'assoleixi a una menor temperatura, de manera que hi hagi un menor gradient osmòtic (vegeu la fig. 6).

La resposta cel·lular a l'estrès osmòtic creat per l'aparició de gel (cosa que equival a extreure aigua líquida i, per tant, a fer que la concentració salina augmenti), consisteix a perdre aigua per reduir les diferències de concentració de soluts intracel·lulars i extracel·lulars. Com més alta és la concentració de sals del medi, més es retrauen les cèl·lules, i per tant, més concentrat es torna el citoplasma cel·lular. És per aquesta raó que el gradient osmòtic creat entre la cèl·lula i el medi de congelació és menor com més baixa és la temperatura, la qual cosa implica

que l'efecte del xoc osmòtic sigui menor a temperatures més baixes.

A bandad'aquest primer efecte, la presència de crioprotectors podria, a la vegada, afavorir la formació d'un sòlid vitri en lloc de cristal·litzat, ja que a temperatures prou baixes, en arribar a una concentració crítica de crioprotector, la viscositat del medi de congelació es tan elevada que s'impedeix la cristal·lització i la formació de gel intracel·lular.

Per què disminueix el punt eutèctic en presència de crioprotectors? Tot fa pensar que s'estableixen ponts d'hidrogen entre els grups -OH o grups =O dels crioprotectors i les molècules d'aigua, de manera que es trenca la cristal·lització ordenada de l'aigua (vegeu la fig. 7).

D'entre les moltes molècules que s'han investigat com a presumptes agents crioprotectors, avui en dia n'hi ha tres

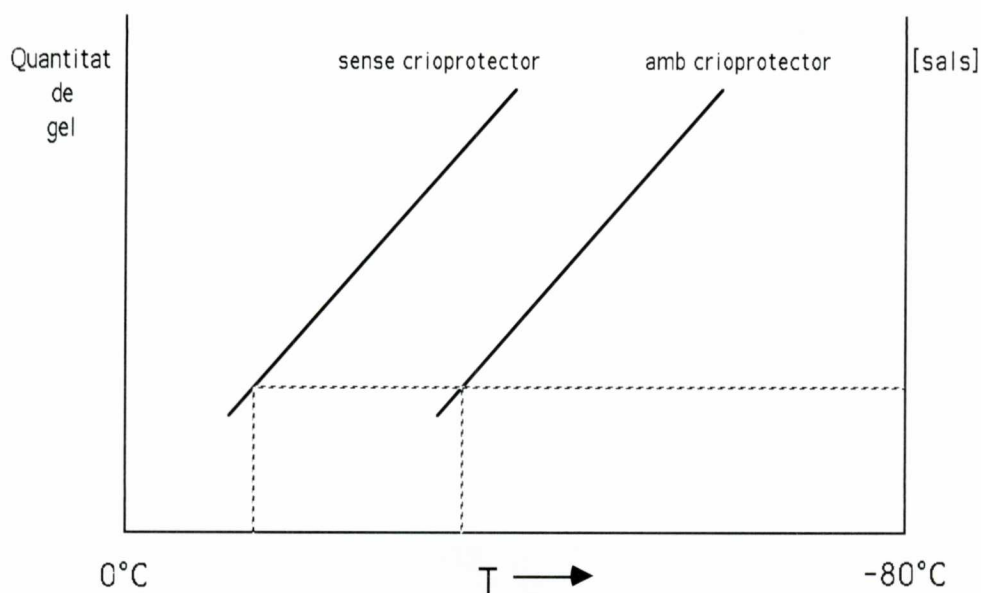


FIGURA 6. Disminució del punt eutèctic d'una solució en presència de crioprotectors.

d'àmpliament acceptades com a tals. Són els anomenats *crioprotectors permeables*, car es tracta de molècules hidrosolubles i de baix pes molecular, propietats que els fan compostos que amb certa facilitat creuen la membrana plasmàtica.

Els crioprotectors més emprats actualment són el glicerol, el dimetilsulfòxid (DMSO) i el propilenglicol (PROH).

A més a més d'aquests tres, n'hi ha dos de menys emprats, el metanol i l'etilenglicol. L'ús de metanol com a crioprotector ha

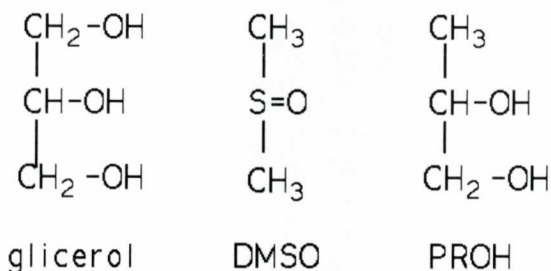


FIGURA 7. Estructura molecular dels tres crioprotectors més habitualment usats.

provocat un cert recel en la comunitat científica perquè es tracta d'un compost altament tòxic, fins a l'extrem que, per als humans, ingestions de l'ordre de només 30 ml provoquen la mort de l'individu.

Incorporació dels crioprotectors

La incorporació dels crioprotectors al medi de congelació es realitza en funció de la rapidesa amb la qual són capaços de creuar la membrana plasmàtica, és a dir, en funció de la seva permeabilitat. Així, l'elecció de crioprotectors de baix pes molecular i «ràpids» (DMSO, metanol) permet addicions de crioprotector en un sol pas. Quan es tracta de crioprotectors lents, com que llur addició brusca fàcilment comporta danys per estrès osmòtic, hom prefereix fer llur introducció d'una manera esglaonada, a través de solucions que incorporin concentracions cada vegada més altes de crioprotector.

L'addició de crioprotectors comporta dos riscos que cal conèixer i controlar:

1. Tot i que es tracta de crioprotectors permeables a membrana, la seva permeabilitat és menor que la de l'aigua.

Els crioprotectors més permeables i consegüentment, més «ràpids» a l'hora d'equilibrar-se són, en ordre creixent, glicerol < DMSO < metanol, segons estudis realitzats amb marcadors radioactius a 0 °C amb l'isòtop [¹⁴C] per al metanol i el glicerol, i l'isòtop [³H] per al DMSO (6).

Un cop afegits, immediatament apareix un gradient osmòtic que provoca la deshidratació i la consegüent retracció cel·lular. A mesura que surt aigua, es perd el gradient, en part a causa de l'augment de la concentració intracel·lular de soluts i en part per l'entrada de crioprotector dins de les cèl·lules. Finalment el gradient osmòtic s'inverteix i les cèl·lules es reinfen.

Un procés de variació dràstica del volum cel·lular porta a la lisi per rebentament o per exposició de les proteïnes intracel·lulars a concentracions massa altes de soluts.

2. La majoria dels crioprotectors, per no dir tots, s'han demostrat tòxics en exposicions perllongades i, sobretot, a altes concentracions.

El grau de toxicitat dels crioprotectors defineix un rang força estret entre les concentracions massa baixes i sense efectes i les concentracions massa altes i citotòxiques. Per al cas concret del PROH, alguns autors ja han demostrat que 1,5 M de PROH és la concentració òptima dins l'estret marge que separa la concentració mínima amb efecte crioprotector de la concentració màxima (3 M de PROH) abans que no es presentin efectes tòxics col·laterals (2).

Altres soluts afegits al medi de congelació

La sacarosa és un disacàrid de glucosa i fructosa impermeable a la membrana plasmàtica, que actualment s'inclou en la majoria dels protocols de congelació per tal de forçar el gradient osmòtic i aconseguir així velocitats més ràpides d'entrada de crioprotector durant la congelació (de manera que es facilita el fet d'aconseguir un equilibri abans de la formació de gel intracel·lular), i també velocitats més ràpides de sortida durant la dilució (de manera que es treu de pressa el crioprotector i es minimitzen els efectes tòxics que pugui ocasionar).

De la mateixa manera que la majoria dels protocols de congelació incorporen la sacarosa com a agent no permeable, també la immensa majoria incorporen alguna macromolècula proteica com a component estabilitzador. En concret, s'usa àmpliament l'albumina sèrica

en diferents concentracions, ja que se li coneix un efecte estabilitzador de membranes, i la congelació/descongelació en gran part es tradueix en processos d'estrès per a les membranes.

Malgrat que no s'ha detectat cap efecte positiu en incrementar la concentració d'albumina en els medis de congelació (19), la presència de l'albumina o alguna altra macromolècula és estrictament necessària, i el seu efecte ja s'observa a baixes concentracions. Les dades publicades per Pope (16) sobre l'efecte de l'albumina sèrica bovina (BSA) indiquen que el nivell òptim de BSA al medi M_2 és de 4 mg/ml, la qual cosa fa pensar que sigui quin sigui l'efecte positiu de la BSA, aquest efecte beneficiós ja s'obté a les concentracions descrites inicialment per Quinn i col·l. (17) en ajustar el seu medi M_2 .

Hi ha altres macromolècules que s'han incorporat als medis de congelació, com la Polivinilpirrolidona [Poli (1-vinil-2-pirrolidona)] (PVP), però els seus efectes beneficiosos no són àmpliament acceptats (Grossmann, dades no publicades).

Amb la presència de crioprotectors hom obté una sensible millora en el percentatge de supervivència postdescongelació. De tota manera, i malgrat la presència de crioprotectors, aquests percentatges es mantenen molt baixos, inferiors al 30 %. Hom hi apunta dos motius:

1. Les solucions de congelació habitualment més usades presenten temperatures de nucleació del gel força altes, i això fàcilment comporta l'aparició de gel intracel·lular.

2. Les concentracions salines assolides són massa altes.

Així doncs, solament amb la presència de crioprotectors en el medi de congelació, no sembla que es puguin aconseguir resultats acceptables de viabilitat postdescongelació. Si

d'aquesta línia en resulta un atzucac, una altra opció de treball és variar el comportament físico-químic dels medis de congelació amb els crioprotectors ja incorporats.

Velocitats de refredament

La permanència de quantitats considerables d'aigua intracel·lular és la causa de la formació de gel intracel·lular. Taxes lentes de refredament permeten una adequada deshidratació, però taxes massa lentes de refredament exposen les cèl·lules durant massa temps als efectes citotòxics dels crioprotectors i de les elevades concentracions salines i apareixerà, si no s'indueix la formació de gel, el fenomen de sobrefredament.

Taxa de refredament

En comparació amb molts altres tipus cel·lulars, els embrions de mamífer requereixen velocitats lentes de refredament. De cara a obtenir la supervivència màxima, hom recomana no sobrepassar taxes d'entre els -0,2 i els -0,5 °C/min a la rampa de refredament des de -10 °C (és a dir, just després de la inducció de la formació de gel) fins -60 °C (temperatura a partir de la qual ja no es detecta activitat proteico-enzimàtica de cap mena).

"Seeding"

La inducció de la formació de gel (*seeding*) a temperatures properes als 0 °C evita el fenomen de sobrefredament i l'efecte d'escalfament i refredament ràpid quan s'allibera la calor latent de fusió. Aquesta

inducció es duu a terme al voltant dels -7°C , i es pot fer manualment o automàtica.

La primera manera, senzillament manual, s'aconsegueix pre-refredant unes pinces mig submergides en N_2L , amb la punta de les quals es toca les parets dels criotubs o de les ampolles. El front de gel progressa des d'aquest punt d'inducció fins a abastar tot el volum del contenidor.

Les altres formes es realitzen a través de mecanismes elèctrics i/o mecànics. D'una banda, hi ha un mecanisme que consisteix en una barra metàl·lica que se submergeix en N_2L i un cop freda es fa rotar fins que fa contacte amb els contenidors on s'ha d'induir el *seeding*.

D'altra banda, només hi ha dos sistemes aptes per a induir la formació de gel en les palletes de congelació. Un és el sistema d'inducció per contacte amb el N_2L , consistent a introduir un fil dins de les palletes fins a la gota de medi on s'ha d'induir el *seeding*. En el moment oportú, l'altre extrem del filament se submergeix en N_2L , i el front de gel que es forma avança tot al llarg del filament fins al medi contingut en la palleta, on indueix al formació de gel.

Hi ha també el sistema d'inducció mitjançant les cèl·lules de Peltier. Aquestes plaques metàl·liques entren en contacte amb les palletes de congelació i durant la congelació, programada, en rebre el corrent elèctric, es refreden per la cara de contacte amb les palletes, mentre que s'escalfen per l'altra cara. Així, igualment s'aconsegueix generar centres de nucleació de gel en solucions que es podien sobre-refredar.

Velocitats de descongelació

Contràriament a allò que es cregué inicialment, avui en dia es coneix que sota determinats règims de congelació lenta els

embrions sobreviuen millor si se'ls sotmet a una descongelació ràpida.

Quan la rampa de congelació lenta s'acaba a l'entorn de -40°C , els embrions contenen encara una quantitat d'aigua que es vitrifica en refredar ràpidament des de -40 fins a -196°C . Si la descongelació és lenta, l'aigua vitrificada evoluciona a gel intracel·lular (per efecte de fenòmens de recristal·lització) i es produeix un estrès osmòtic per la mateixa presència del gel intracel·lular, amb conseqüències letals. En aquests casos, la descongelació consisteix a treure els contenidors del banc de N_2L , deixar-los uns segons a temperatura ambient i tot seguit introduir-los en un bany d'aigua pre-escalfada a 30°C , de tal manera que les velocitats d'escalfament són de l'ordre dels $350^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Oposadament a tot això, si la rampa de congelació lenta s'acaba al voltant dels -70°C , la velocitat òptima de descongelació també és lenta (taxes entre 4 i $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Hom apunta la hipòtesi que aquests embrions tan deshidratants com a conseqüència del llarg període de refredament, necessiten força temps per a rehidratar-se i permetre l'acoblament de bell nou de les estructures subcel·lulars.

Amb aquests règims de descongelació, hom també intenta evitar xocs osmòtics. S'ha observat que, després d'haver estat exposades a condicions hipertòniques, moltes cèl·lules queden destruïdes quan són retornades a solucions isotòniques (com succeeix en els processos de congelació/descongelació).

Aquest fenomen s'explica perquè, a baixes temperatures i com a conseqüència de la variació de la permeabilitat de membrana i de les altes concentracions de soluts, alguns electròlits extracel·lulars podrien entrar en les cèl·lules. En retornar a condicions de baixa concentració de sals, es podria produir una entrada massiva d'aigua a les cèl·lules per tal de compensar la

seva hipertonía, cosa que en definitiva provocaria l'explosió cel·lular.

Dilució de crioprotectors

El crioprotector és menys permeable que l'aigua; per tant, la seva presència pot crear problemes osmòtics.

Com ja hem esmentat abans, la introducció del crioprotector es fa per passos successius si s'utilitza un crioprotector poc permeable. Si s'utilitza un crioprotector «ràpid», de pes molecular petit i ràpida difusió a través de la membrana (p. ex, DMSO, metanol), aquest es pot introduir d'una sola vegada.

A la descongelació, un cop fet l'escalfament de les mostres, es fa necessari extreure el crioprotector. Igualment com en el protocol de la seva introducció, atenent el grau de

permeabilitat en membrana, hi ha crioprotectors que es poden diluir en un sol pas i crioprotectors que requereixen una bateria de passos de dilució.

La raó rau en les velocitats d'entrada d'aigua i de sortida de crioprotectors, car l'aigua entra molt més de pressa que no en surt el crioprotector, de manera que les cèl·lules s'inflen i poden arribar a rebentar.

A banda de tot això, i per tal d'evitar el risc d'excessiu inflament cel·lular, hom ha plantejat els dos protocols següents (vegeu la fig. 8):

1. Dilució per passos. La probabilitat de lisi cel·lular es redueix eliminant el crioprotector en passos successius, cada cop en solucions amb concentracions menors de crioprotector, i deixant un temps en cada pas per què s'aconsegueixi l'equilibri i es recuperi el volum cel·lular.

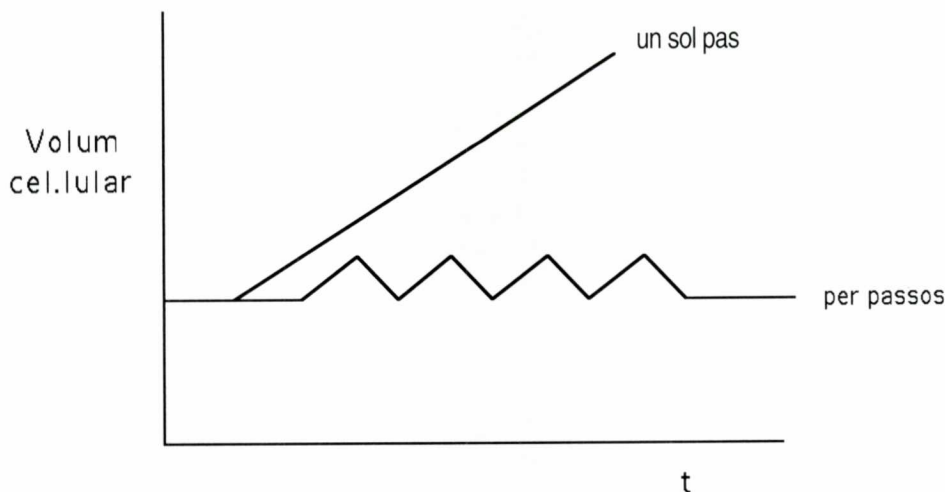


FIGURA 8. Evolució del volum cel·lular durant el procés de dilució del crioprotector segons el mètode de dilució.

2. Adició prèvia de sacarosa. En aquesta metodologia, molt emprada en protocols de congelació/descongelació d'òcits i d'embrions, la sacarosa s'utilitza per a deshidratar les cèl·lules i treure'n el crioprotector. A continuació es va diluint la sacarosa per passos.

Aquest sistema, hom l'utilitza sobretot per als crioprotectors més lents, com és el cas del PROH i del glicerol.

VITRIFICACIÓ (*quick freezing*)

Per tal d'evitar el procés de congelació lenta, que requereix aparells costosos i molt de temps, des de mitjan segle s'intenta aplicar la vitrificació a la criopreservació de material biològic. Es tracta d'usar solucions de congelació amb concentracions molt altes de diferents crioprotectors, la qual cosa evita la cristal·lització, perquè aquestes solucions tan denses, en lloc de cristal·litzar, en refredar-se esdevenen tan viscoses que formen un sòlid vitri.

Medis

Les solucions de vitrificació per a embrions de mamífers basen en els medis desenvolupats per Rall i Fanhy (18) que a partir del medi PBS modificat, conformen una barreja de diferents crioprotectors suficientment concentrada com per prevenir la cristal·lització.

En concret, la solució VS1 descrita per Rall i Fanhy conté:

- Quantitats equimolars de DMSO i d'acetamida, ja que algunes amides redueixen els efectes químic-tòxics de les solucions concentrades de DMSO. Ara bé, moltes amides, i en concret l'acetamida, són agents que semblen tenir un elevat poder cancerigen.

- Propilenglicol, per la seva tendència a formar glaç.

- Polietilenglicol, com a solut no permeable als embrions que incrementa la capacitat vitrificadora de la solució.

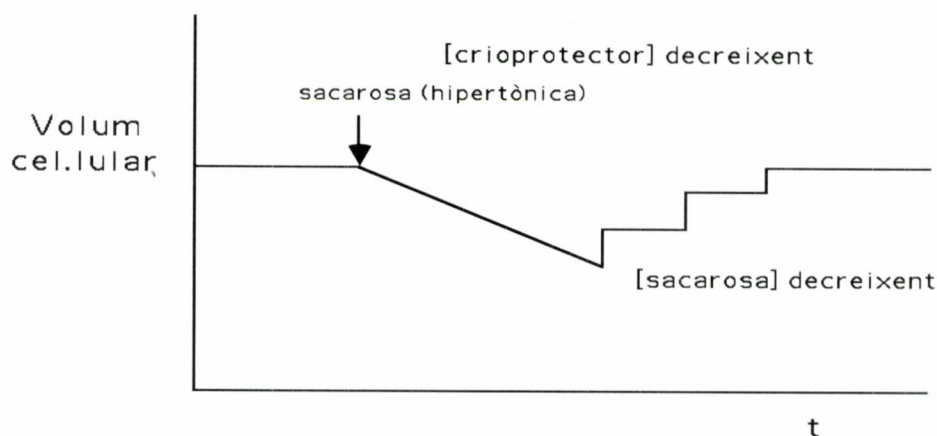


FIGURA 9. Evolució del volum cel·lular durant la dilució del crioprotector en presència de sacarosa.

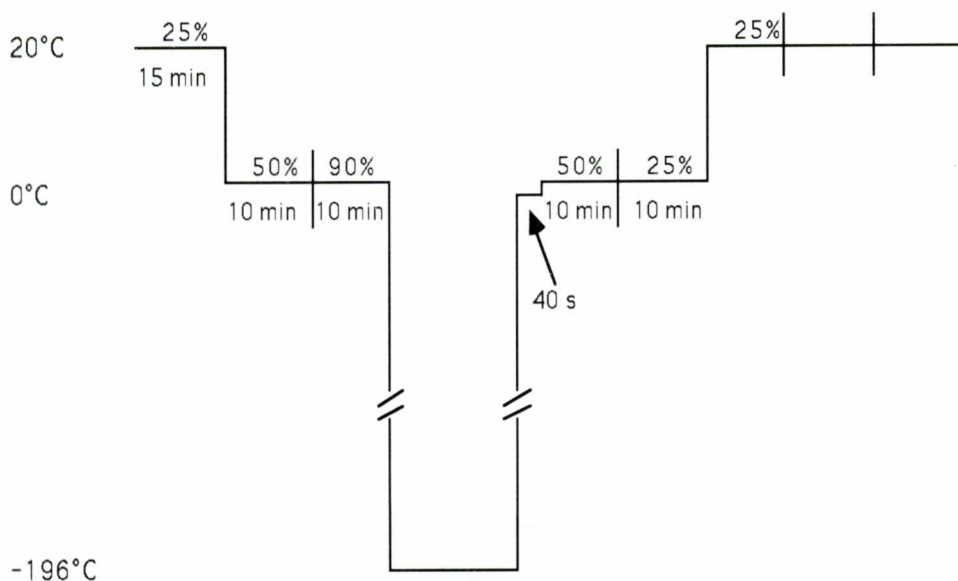


FIGURA 10. Protocol de refredament i escalfament durant el procés de vitrificació

Protocol

Els embrions se suspensen en 90 % de VS1 i s'hi mantenen durant 10 min per al seu equilibri (vegeu la fig. 10). Les cèl·lules, un cop deshidratades, es refreden molt ràpidament (la taxa de refredament ha d'ésser superior als 200 °C/min), bé per submersió directa en N_2L , bé per refredament en vapor de N_2L prèviament a la immersió.

Després del període d'emmagatzematge, l'escalfament també ha d'ésser ràpid (taxa d'escalfament també superior als 200 °C/min), de cara a prevenir efectes letals com el de la recristal·lització entre -100 °C i -25 °C. Això es concreta en: escalfar les mostres en un bany a 4 °C i no sobrepassar aquesta temperatura fins

que no s'hagi diluït com a mínim un 25 % de la solució VS1. En un intent de reduir un excés d'estrès osmòtic, a partir d'aquí el crioprotector es treu segons dos protocols diferents:

a) dilució esglaonada i en múltiples passos de la solució VS1;

b) dilució directa en un medi PB1 amb altes concentracions de sacarosa (7).

La vitrificació proporciona un protocol senzill, curt i sense necessitat d'induir la formació de gel, en el que la taxa de refredament/escalfament no té una importància excessiva.

El punt clau del procés de vitrificació és l'equilibrament de les cèl·lules amb la solució de congelació, de cara a obtenir cèl·lules amb llur citoplasma deshidratat i concentrat (capaç de vitrificar) però sense col·lapse. Els punts

crítics de la vitrificació són un excessiu estrès osmòtic durant els passos d'equilibri i dilució dels medis de congelació i la mort per toxicitat química a causa de les elevades concentracions dels crioprotectors si s'allarga el temps d'exposició de les cèl·lules a les solucions de vitrificació.

Malgrat alguns bons resultats en la viabilitat embrionària posterior a la vitrificació, semblen existir certes reticències a utilitzar-lo. Per exemple, tot i obtenir embrions aparentment viables postvitrificació, el percentatge d'implantacions en l'espècie humana és molt baix. Recentement, l'equip de Feichtinger (4), han aconseguit un 9,8 % d'embarassos a partir d'embrions congelats usant el mètode de congelació ultraràpida descrit per Trouson l'any 1987 (21). D'aquests embarassos ja han nascut cinc nadons sans. Aquesta taxa és similar a la que s'obté amb la congelació lenta i usant PROH com a crioprotector, encara que aquesta nova tècnica és més senzilla i ràpida.

BIBLIOGRAFIA

- CHANG, M. C. i A. WALTON. (1940) The effect of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. **Proc. R. Soc., Lon.**, **129**: 517-527.
- DAMIEN, M.; A. LUCIANI i J. J. PELUSO. (1989) Propanediol-induced alterations in membrane integrity, metabolism and developmental potencial of mouse zygotes. **Hum. Reprod.** **4**: 969-974.
- EDWARDS, R. G. and P. C. STEPTOE. (1977) The relevance of the frozen storage of human embryos. The freezing of mammalian embryos. (Elliot, K. & Whealan, J.), **Ciba Fdn. Symp.** **52**: 235-250.
- FEICHTINGER, W.; C. HOCHFELLNER i V. FERSTL. (1991) Clinical experience with ultra-rapid freezing embryos. **Hum. Reprod.** **6**: 735-736.
- GLENISTER, P. H.; M. WOOD, C. KIRBY i D. G. WHITTINGHAM. (1987) Incidence of chromosome anomalies in ferts-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. **Gam. Res.** **16**: 205-216.
- HARVEY, B. i M. J. ASHWOOD-SMITH. (1982) Cryoprotectant penetration and supercooling in eggs of salmonid fishes. **Cryobiol.** **19**: 29-40.
- LEIBO, S. P. i P. MAZUR. (1978) Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. *Methods in mammalian reproduction.* (Daniel, J. C.) pp. 179-201.
- LOVELOCK, J. E. (1953) The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. **Biochem. Biophys.** **10**: 414-426.
- LUYET, B. J. i HODAPP. (1938) Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **39**: 433.
- LUYET, B. J. i P. MP GEHENIO. (1940) Life and death at low temperatures. **Biodynam.** Normandy, MO.
- MAZUR, P. (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **J. Gen. Physiol.** **47**: 347-369.
- MAZUR, P. (1977) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiol.** **14**: 347-369.
- MERYMAN, H. T. (1968) Modified model for the mechanisms of freezing injury of erythrocytes. **Nat.** **218**: 333-336.
- MORRIS, G. J. i P. F. WATSON. (1984) Cold shock injury - a comprehensive bibliography. **Cryo-let.** **5**: 352-372.
- POLGUE, C.; A. U. SMITH i A. S. PERKES. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nat.** **164**: 666.
- POPE, A. K.; K. L. HARRISON, L. M. WILSON, T. M. BREEN i J. M. LUMINS. (1987) The optimum concentration of Albumin as embryo cryoprotectant. **J. in vitro Fertil. Embr. Transf.** **14**: 228-291.
- QUINN, P.; C. BARROS i D. G. WHITTINGHAM. (1982) Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** **66**: 161-168.
- RALL, W. F. i G. M. FANHY. (1985) Ice-freezing cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. **Nat.** **313**: 573-574.
- SANTALÓ, J.; M. GROSSMANN, C. GIMENEZ, F. VIDAL i J. EGOZCUE Cryopreservation of zona-free embryos. **Llibre de resums de ESHRE-ESCO second joint meeting.** Milà (Itàlia), 1990.
- SPALLANZANI, L. (1776) Osservazioni, e sperienze intorno ai vermicelli spermatiei dell'uomo e degli animali. **Opuscoli di fisica animale, e vegetabile. Opuscolo II.** Moderna.
- TROUNSON, A.; A. PEURA i C. KIRBY. (1987) Ultra-rapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo preservation. **Fert. & Steril.** **48**: 843-846.
- WHITTINGHAM, D. G.; S. P. LEIBO i P. MAZUR. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196 °C and -269 °C. **Scie.** **178**: 411-417.
- 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.** **11**: 1071-1079.