

CONGELACIÓ D'EMBRIONS HUMANS

GLORIA CALDERÓN

Secció de Biologia. Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Dexeus. Barcelona.

RESUM

La congelació d'embrions és una eina imprescindible avui en dia en tots els programes de fecundació *in vitro*, a causa del nombre d'òcits i embrions que s'obtenen per cycle de tractament.

El protocol més utilitzat és el que congela embrions en l'estadi de pronucli, de dues cel·lules i de quatre cel·lules i que fa servir el propilenglicol i la sacarosa com a crioprotectors.

Es revisen els diferents protocols descrits en la literatura i s'analitzen les causes per les quals són més o menys eficaços.

SUMMARY

Human embryo freezing was started in 1981 in Australia by the team of Trouson and collaborators, because of the high number of embryos obtained in IVF with superovulation induction treatments.

There are different cryopreservation methods depending on the cryoprotectant used for freezing zygotes (pronuclear stage) or cleaved embryos:

- Dimethylsulfoxide (DMSO) is used for blastocysts with slow freezing and rapid thawing.
- Glicerol is used for blastocysts with slow freezing and rapid thawing.
- Propandiol (PROH) is used for pronuclear as well as 2, 4 and 8 cell stages with slow freezing and rapid thawing.

— The ultrarapid freezing is performed with DMSO and the freezing and thawing are rapid.

The embryo survival rates achieved are 50-70% depending on the method used and the quality of the frozen embryos.

INTRODUCCIÓ

Fou l'any 1981 que els australians Alan Trounson i els seus col·laboradors van començar els estudis sobre congelació d'embrions humans a causa de l'excés d'embrions que s'obtenia en els cicles de fecundació *in vitro*, degut a la introducció dels tractaments hormonals estimuladors de l'ovulació. Aquests estudis es basaven en l'experiència d'aquest equip en la congelació d'embrions bovins.

Aviat arribaren a la conclusió que el millor crioprotector era el dimetilsulfòxid (DMSO) i que els millors resultats s'obtenien congelant embrions en llurs primers estadis de desenvolupament (4-8 cèl·lules). La congelació es feia lentament, i també la descongelació. De tota manera, no fou fins al 1983 que aconseguiren el primer embaràs humà, que es va perdre a les vint-i-quatre setmanes de gestació.

PRINCIPIIS CRIOBOLÒGICS

Quan les cèl·lules o els teixits són sotmesos a baixades de temperatura molt per sota del punt de congelació del medi que les envolta, succeeixen un elevat nombre d'esdeveniments biològics i físico-químics.

El descens de temperatura *per se* té un clar efecte en la coordinació de la bioquímica de la cèl·lula, atès que la majoria de les reaccions enzimàtiques pròpies de la cèl·lula es fan més lentes o desapareixen. Si continua baixant la temperatura, la solubilitat dels gasos augmenta, i aquest augment té un paper important en la destrucció de les cèl·lules durant el procés de congelació/descongelació.

El punt de congelació de la majoria de les solucions crioprotectors se situa entre -3°C i -4°C encara que rarament es congelen a

aquestes temperatures en absència de nucleació, perquè es produeix invariablement el fenomen de *supercooling*. Wittingham, l'any 1977 (21), demostrà que, per obtenir resultats en els processos de congelació, era vital evitar els fenòmens de *supercooling*. El mètode més eficaç per evitar aquest fenomen era induir la formació del gel, (o *seeding*) d'una manera manual, bé introduint un cristall de gel del medi de congelació en la mostra, bé tocant la mostra amb unes pinces metàl·liques refredades en nitrogen líquid, quan la temperatura arribava a -7°C .

El punt eutèctic del clorur sòdic se situa a -21.5°C . Just abans d'arribar a aquest punt, la congelació del clorur sòdic és màxima i comença la cristal·lització de les sals de l'aigua. Els punts eutèctics d'altres sals, components habituals dels medis de cultiu, se situen entre -10°C i -17°C . Les cèl·lules són fàcilment destruïdes en el rang de temperatura que comprèn des del punt de congelació de la solució fins a $-30^{\circ}\text{C}/-40^{\circ}\text{C}$. Les cèl·lules són sotmeses a unes altes variacions de la pressió osmòtica causa de la transformació de l'aigua en gel. Les sals augmenten la seva concentració de tal manera que es converteixen en tòxiques per a la cèl·lula, i són les causants de la seva destrucció. Els crioprotectors afegits als medis de congelació, són, en part, els responsables d'equilibrar les concentracions de les sals del medi, i d'aquesta manera eviten els efectes tòxics per a la cèl·lula.

D'altra banda, la velocitat de congelació i descongelació d'alguns composts químics no tòxics poden protegir la cèl·lula de la destrucció associada a la congelació/descongelació. Tots els mètodes de congelació tenen molt en compte la velocitat a la qual les cèl·lules passen aquesta zona crítica entre el punt de congelació i l'eutèctic, tant durant la congelació com en la

descongelació: si la velocitat de descens de la temperatura és molt ràpida, no s'evitarà la formació de gel intracel·lular i si és molt lenta la cèl·lula es deshidratarà massa, a causa dels canvis en la pressió osmòtica i la cèl·lula es colapsarà o es veurà sotmesa durant massa temps als efectes tòxics de les altes concentracions de sals.

CRIOPROTECTORS

Es poden utilitzar diversos crioprotectors en la congelació d'embrions humans. Els crioprotectors són composts químics que no han d'ésser tòxics per a la cèl·lula o el teixit que ha d'ésser criopreservat i que afegits en quantitats molars poden protegir-los dels efectes nocius de la congelació-descongelació.

Encara que el *metanol* és altament tòxic per al cos humà, és un excel·lent crioprotector dels embrions humans. El problema resideix en què, per sota de -35°C , si la temperatura continua baixant lentament, el metanol deixa d'actuar com a crioprotector i a les seves altes concentracions es converteixen en tòxiques. Això es podria evitar controlant la velocitat a la qual es congela i són els comitès científics i les autoritats les que prohibeixen el seu ús. Una altra raó que fa desaconsellable el seu ús com a crioprotector és la seva capacitat d'induir amb facilitat fenòmens de partenogènesi.

El *glicerol* és un bon crioprotector per a embrions i no és tòxic per a les cèl·lules en les concentracions en les quals s'utilitza. L'únic problema és que travessa la membrana cel·lular molt lentament. D'aquesta manera, quan s'inclou o s'exclou de la cèl·lula, triga tant de temps que de vegades la cèl·lula no suporta l'estrès osmòtic al qual es veu sotmesa.

El *dimetilsulfòxid* (DMSO) travessa ràpidament les membranes cel·lulars, i evita d'aquesta manera l'estrès osmòtic.

L'*1,2-propanodiol* o PROH travessa les membranes cel·lulars més ràpidament que el DMSO, i aquesta és una de les raons per les quals s'ha convertit en el crioprotector més utilitzat per a la congelació d'embrions humans.

Els quatre crioprotectors esmentats són molt solubles en aigua, i a més posseeixen la propietat d'alterar la seva estructura trencant els ponts d'hidrogen, i, alhora, són capaços de formar ponts d'hidrogen amb llurs mol·lècules.

CONGELACIÓ D'EMBRIONS HUMANS

En general, els mètodes utilitzats en la congelació d'embrions humans, segueixen, quasi al peu de la lletra, els mètodes utilitzats en la congelació d'embrions d'altres mamífers. (3, 22).

Actualment hi ha quatre protocols de congelació d'embrions humans descrits en la literatura.

a) Descrit per Trounson i Mohr el 1983 (17), s'utilitza com a crioprotector el DMSO en una concentració d'1,5 M. El crioprotector s'inclou en l'embrió d'una manera esglaonada a temperatura ambient. La congelació es fa lentament. El *seeding* es realitza a -7°C i la temperatura continua baixant lentament ($0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) fins a -8°C ; després, els embrions són submergits directament en nitrogen líquid. La descongelació es fa lentament i esglaonadament des de -80°C (a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) fins a 4°C . El DMSO s'extreu de l'embrió poc a poc i s'equilibra lentament fins a 37°C .

Amb aquest protocol, els millors resultats s'obtenen congelant embrions en estadi de 4-8

cèl·lules. Els primers infants nascuts en el món fruit de la congelació d'embrions, ho varen ser amb aquest protocol (6, 17, 23). Avui dia es continua utilitzant aquest protocol de congelació encara que els resultats han estat àmpliament superats pel protocol francès i tenint en compte que, d'altra banda, es tracta d'un protocol llarg i costós de desenvolupar.

b) Descrit per Cohen i col·l. el 1983; com a crioprotector s'utilitza el glicerol al 8 %. Només s'utilitza per a la congelació de blastòcits a temperatura ambient. La congelació es fa lentament, realitzant el *seeding* a -7°C i seguint molt lentament ($0,3^{\circ}\text{C} / \text{min}$) el descens de temperatura fins a -36°C . Després, les mostres són submergides en nitrogen líquid. La descongelació es fa ràpidament passant de nitrogen líquid a un bany a 30°C , fins que es desfà el gel. El glicerol s'extreu a poc a poc del blastòcit a temperatura ambient.

Els millors resultats amb aquest protocol, quant a la taxa de supervivència i d'embaràs, s'aconsegueixen congelant blastòcits que comencen a expandir-se o que estan completament expandits (5).

Aquest protocol ha estat abandonat, ja que tan sols el 25 % dels embrions obtinguts en el laboratori arriben a l'estadi del blastòcit expandit. De tota manera, s'ha de recordar que la taxa de supervivència d'aquest protocol se situa al voltant del 80 %, i que les possibilitats d'implantació d'un blastòcit congelat/descongelat són molt superiors a les de transferència de 3 embrions del cicle inicial de fecundació *in vitro* (4).

c) Descrit per Lasalle i col·l. el 1985. Conegut com el «mètode francès». Com a crioprotector s'utilitza l'1,2-propanodiol (1,5 M) que s'afegeix a l'embrió en un sol pas a temperatura ambient, i la sacarosa (0,1 M) que s'afegeix tan sols al medi de congelació.

La congelació es fa lentament. El *seeding* s'indueix automàticament a -7°C i després la temperatura baixa lentament ($0,3^{\circ}\text{C} / \text{min}$), fins a -30°C ; després, els embrions són submergits directament en nitrogen líquid. Després la descongelació es fa ràpidament; del nitrogen líquid es passa a temperatura ambient durant 40 segons i després a un bany a 30°C durant 40 segons més. El crioprotector s'extreu de l'embrió a poc a poc a temperatura ambient i a tots els medis de descongelació se'ls afegeix una concentració 0,2 M de sacarosa. La funció de la sacarosa, tant durant la congelació com durant la descongelació, és ajudar l'embrió a la seva deshidratació: en la congelació, per facilitar l'expulsió de l'aigua i la inclusió del crioprotector, i durant la descongelació facilita el procés invers. Els millors resultats amb aquest protocol s'aconsegueixen congelant embrions en pronúclis, (2PN) 2 i 4 cèl·lules. La taxa més alta de supervivència (70 %) s'aconsegueix en l'estadi de 2PN i, quan s'utilitza per a congelar embrions ja dividits, es recomana que els blastòmers tinguin nucli (13).

Aquest protocol és més senzill i ràpid de fer servir que els anteriorment descrits, i també són millors els resultats quant a la taxa de supervivència i embaràs (2). Per aquests motius, actualment, és el protocol més utilitzat pels equips que treballen en fecundació *in vitro* en tot el món.

d) Mètode ultraràpid de congelació descrit per Trounson el 1988. L'avantatge d'aquest protocol és que no és necessària la utilització dels sofisticats congeladors imprescindibles en els mètodes anteriorment descrits. El protocol inicialment proposat per Trounson obtenia immillorables resultats quant a la taxa de supervivència i implantació en el ratolí, però en traslladar-lo al model humà, encara que es

mantenien excel·lents resultats en la taxa de supervivència dels embrions, es van obtenir molt poques gestacions. Recentment (7), altres autors han publicat modificacions d'aquest mètode amb les quals les taxes de supervivència i embaràs són totalment comparables a les obtingudes pel mètode francès (19). Aquestes modificacions consisteixen en un augment de la concentració de DMSO fins a 4,5 M i de la de sacarosa fins a 0,3 M. El medi de congelació es manté a 4 °C durant 12-24 hores i els embrions s'afegeixen directament a aquest medi durant 3 minuts a 0 °C. Després són submergits directament en nitrogen líquid. La descongelació es fa ràpidament submergint els embrions en un bany a 37 °C. El crioprotector s'extreu en un sol pas a temperatura ambient amb una concentració 0.3M de sacarosa. Amb aquestes modificacions s'han aconseguit fins al moment 9 embarassos, però cal continuar els estudis per comprovar realment la seva eficàcia.

SUPERVIVÈNCIA EMBRIONÀRIA

Es considera que un embrió sobreviu intacte el procés de congelació/descongelació quan tots els blastòmers queden intactes després del procés. Es denomina parcialment intacte quan al menys el 50 % dels seus blastòmers sobreviuen al procés. Fins que Veiga i col·l. (20) publicaren un article sobre un embaràs aconseguit amb un embrió congelat en el qual solament un dels seus blastòmers havia sobreviscut després de la congelació, només es transferien els embrions en els quals almenys el 50 % de llurs blastòmers romanien intactes després del procés. S'ha de tenir en compte que les cèl·lules dels embrions humans fins a l'estadi de 8 cèl·lules són totipotents, i per això cada blastòmer és capaç de desenvolupar-se per ell

mateix i donar lloc a un embaràs a terme amb un fetus totalment normal. Des d'aquest moment es recomana la transferència de tots els embrions que tinguin almenys un blastòmer intacte post/descongelació, ja que existeixen possibilitats reals que s'implanti encara que aquestes siguin menors que les d'un embrió intacte. En el cas dels blastòcits, es considera que sobreviuen el procés quan hi ha una reexpansió del blastocel amb poc temps de cultiu *in vitro*, quan hi ha una total absència de cèl·lules necròtiques i quan la morfologia general és adequada.

Amb el pas dels anys els resultats que s'han obtingut amb la congelació dels embrions humans no han estat tan bons com es podia esperar. S'ha intentat trobar la causa d'aquest fenomen analitzant diversos paràmetres en l'estadi en què han estat congelats els embrions, llur ritme de divisió i llur morfologia. No s'ha trobat relació entre els paràmetres estudiats i la taxa de supervivència o d'embaràs.

El fenomen tampoc no es pot atribuir als mètodes de congelació, ja que no han variat des dels seus inicis. Per tot això, sembla que la causa resideix en la introducció de nous tractaments estimuladors de l'ovulació dins dels cicles de FIV. En un estudi realitzat per Calderon i col·l. (2) sobre 800 embrions descongelats es van trobar diferències significatives en la taxa de supervivència dels embrions que provenien de cicles estimulats amb citrat de clomifè i gonadotropines enfront dels que provenien de cicles amb anàlegs de la GnRH. Pel que fa a la taxa d'embaràs dels embrions que provenien dels cicles tractats amb citrat de clomifè, aquesta era bastant més elevada que la que s'obtenia amb embrions que provenien de cicles tractats amb anàlegs. La introducció dels anàlegs de la GnRH per a estimulació ovàrica en els cicles de fecundació

in vitro significa obtenir una hiperestimulació ovàrica, i per tant s'obtenen en cada cicle de tractament un nombre molt elevat d'òcits, la qualitat dels quals no és sempre l'adequada. Això es tradueix en una pitjor qualitat embrionària i, per tant, en una menor taxa de supervivència després de la congelació/descongelació (14).

Recentment, Cohen i col·l. han publicat una sèrie curta de casos on es posa de manifest que els embrions que provenen de cicles tractats amb agonistes de la GnRH posseeixen un metabolisme més ràpid que altres, i per tant han d'ésser congelats entre les 20 i 24 hores post-inseminació. D'aquesta manera les taxes de supervivència augmenten considerablement. Caldria estudiar sèries més llargues per a poder arribar a conclusions definitives.

D'altra banda, Toner i col·l. (16) i Fugger i col·l. (10) acaben de publicar llurs resultats en congelació d'embrions humans, i no troben diferències significatives en les taxes de supervivència dels embrions que provenen de cicles tractats amb anàlegs de la GnRH o amb citrat de clomifè i HMG; només troben diferències en les taxes de fecundació, però com que el nombre d'òcits és més gran, també augmenta la possibilitat de congelar algun embrió i, per tant, la taxa acumulada d'embrions augmenta significativament. També troben diferències significatives en les taxes d'embaràs múltiple en transferir 2 o 3 embrions descongelats enfront de la transferència en fresc del mateix nombre d'embrions.

En el que sí que estan d'acord la majoria dels equips que han presentat els seus resultats sobre congelació d'embrions és que les taxes d'embaràs en el cicle de criotransferència són exactament les mateixes pel mateix nombre d'embrions transferits en el cicle en fresc. Aquesta és la prova definitiva que els mètodes de congelació anteriorment descrits són

completament vàlids i han de continuar essent utilitzats pels equips que treballen en FIV.

BIBLIOGRAFIA

1. ASHWOOD-SMITH, M. J. (1986) The cryopreservation of Human Embryos. **Hum. Reprod.** 1: 319-332.
2. CALDERON, G., A. VEIGA, I. BELIL, B. ARAN, F. MARTÍNEZ i P. N. BARRI. (1990) Criopreservación - Embrionaria. Libro de ponencias XIX. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad.
3. CIBA FOUNDATION. (1977) The Freezing of mammalian Embryos. **Elsevier**. Amsterdam.
4. COHEN, J., R. F. SIMON, C. B. FEHILLY, R. G. EDWARDS, J. HEWITT, G. F. ROWLAND, P. C. STEPTOE i J. M. WEBSTER. (1983) Birth after replacement of hatching blastocysts cryo-preserved at expanded blastocyst stage. **The Lancet**. pp. 647.
5. COHEN, J., R. F. SIMON, C. B. FEHILLY i R. G. EDWARDS. (1986) Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. **I.V.F. i E.T.** 3: 46-52.
6. DOWNING, B. G., L. R. MOHR, A. O. TROUNSON, L. E. FREEMAN i C. WOOD. (1985) Birth after transfer cryopreserved embryos. **Med. J. Aust.** 142: 409-411.
7. FEICHTINGER, W., C. HOCHFELLNER i L. FERST. (1991) Clinical experience with ultra-rapid freezing of embryos. **Hum. Reprod.** 6: 735-736.
8. FREEMANN, L., A. TROUNSON i C. CIRBY. (1986) Cryopreservation of human embryos: progress on the clinical use of the technique in human *in vitro* fertilization. **I. V. F. i E. T.** 3: 53-61.
9. FREEMANN, D., J. COHEN, M. SUZMAN, G. WRIGHT, H. KORT i J. MASSEY. (1991) Stimulation cycles suppressed with gonadotropin-releasing hormone analog yield accelerated embryos. **Fertil. Steril.** 55: 792-796.
10. FUGGER, E. F., M. BUSTILLO, A. D. DORFMANN i J. D. SCHULMANN. Human preimplantation embryo cryopreservation: selected aspects. **Hum. Reprod.** 6: 131-135.
11. LASSALLE, B., J. TESTART i J. P. RENARD. (1985) Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. **Fertil. Steril.** 44: 656-651.
12. MENEZO, Y. J., J. F. GUERIN i J. C. CZYBA. (1990) Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of vero cells. **Biol. Reprod.** 42: 301-306.

13. TESTART, J. i col·l. (1986) High pregnancy rate early human embryo freezing. **Fertil. Steril.** 46: 268-272.
14. TESTART, J., M. VOLANTE, A. GAZENGEL, I. GAZAGNE, J. BELAISCH-ALLART, R. FORMAN, A. MAZOUT i R. FRYDMAN. (1988) Development and clinical application of embryo cryopreservation. Personal communication ESHRE BARCELONA.
15. TESTART, J., R. FORMAN, J. BELAISCH-ALLART, M. VOLANTE, A. MOZOUT, N. STRUBB i R. FRYDMAN. (1989) Embryo quality and uterine receptivity in in-vitro fertilization cycles with or without agonist of gonadotrophin - releasing hormone. **Hum. Reprod.** 4: 198-201.
16. TONER, J. P., M. G. BRAZYSKI, S. OECHNINGER, LL. VEECT, S. SIMONETTI i S. J. MUASMER. (1991) Combined impact of the number of pre-ovulatory oocytes and cryopreservation on the IVF outcome. **Hum. Reprod.** 6: 284-289.
17. TROUNSON, A i L. MOHR. (1983) Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. **Nature.** 305: 707-709.
18. TROUNSON, A. i P. SJÖBLOM. (1988) Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. **Fertil. Steril.** 50: 373-375.
19. VAN-STEIRTEGHEM, A. C. i E. VAN DEN ABBEN. (1989) World results of human oocyte and embryo cryopreservation. Abstracts of the VIth congress of in vitro fertilization and alternate assisted reproduction, Jerusalem. p. 21.
20. VEIGA, A., G. CALDERON, P. N. BARRI i B. COROLEU. (1987) Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with <50% intact blastomers. **Hum. Reprod.** 2: 321-323.
21. WHITTINGHAM, D. G. (1977) Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. Ciba Foundation, Elsevier, Amsterdam. pp: 97-108.
22. WHITTINGHAM, D. G. (1980) Partenogenesis in mammals. In Finn, C. A. (ed.). Oxford Reviews of reproductive biology. Clarendon Pres. 2: 205-231.
23. ZEILMAKER, G. H., A. TH. ALBERDA, I. VAN GENT, C. M. M. P. RIJKAUNS i A. C. DRIGENBDIJK. (1984) Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. **Fertil. Steril.** 2: 293-296.