

SUPERVIVÈNCIA D'EMBRIONS HUMANS A LA CONGELACIÓ-DESCONGELACIÓ

D. COMPANYY, P. MARTÍN, S. MENÉNDEZ, S. MARINA

Institut de Reproducció CEFER. Barcelona.

Supervivència d'embrions humans a la C-D

El fet que cèl·lules animals es mantinguessin amb vida després de descongelades va ser observat ja fa més de 200 anys per Spallanzani que, el 1776, va veure que els espermatozoides de cavall tornaven a moure's després de descongelar-los. A partir d'aleshores, la criopreservació s'ha anat establint en diferents tipus de cèl·lules i de teixits animals. Avui en dia la congelació d'embrions és un fet acceptat arreu del món.

El primer èxit en la congelació d'embrions l'obtingué Whittingham l'any 1972 utilitzant embrions de ratolí. La tècnica va aplicar-se a d'altres espècies: conill, rata, ovella, cabra, vaca, etc.

Va ser el 1983 quan els australians obtingueren el primer embaràs d'embrions humans congelats i descongelats.

La tècnica de congelació d'embrions es pot aplicar en casos diferents:

1. Quan existeixen embrions supernumeraris després d'un cicle de FIV (Fecundació *In Vitro*): La FIV es fa normalment a dones a les quals s'han estimulat l'ovulació, la qual cosa fa que s'obtinguin varis oòcits amb possibilitat de ser fecundats. Si el semen és fèrtil, són moltes les parelles que disposen de més de tres embrions per a la transferència (TE). Ha estat demostrat que la TE simultània de més de 3 o 4 embrions no augmenta les possibilitats d'embaràs però augmenta el risc d'un embaràs múltiple. És per aquest motiu que es tendeix a transferir 2 o 3 embrions al cicle de FIV i congelar la resta. D'aquesta manera es proporciona a la dona una oportunitat nova d'aconseguir l'embaràs sense haver de sotmetre-la a noves estimulacions ovàriques i captacions d'òvuls, reduint així les despeses físiques, psicològiques i econòmiques de la tècnica.

2. Donació d'oòcits: els oòcits s'inseminen amb els espermatozoides del marit de la receptora. En aquest cas, la congelació d'embrions aconseguits donats i fecundats amb espermatozoides del marit de la receptora és útil perquè d'aquesta manera s'evita haver de sincronitzar els cicles menstruals de la donant i de la receptora. És, a més a més, una manera de facilitar l'anonimat.

3. Donació d'embrions: els oòcits donats s'inseminen amb semen d'un donant. Útil, en aquest cas, perquè permet l'existència d'un banc de semen utilitzable per les parelles en les quals cap dels dos pot aportar els seus gàmetes. La congelació d'embrions demana la utilització d'un medi crioprotector que impedeixi o redueixi la formació de cristalls de gel que es produeixen durant la congelació i que poden danyar la cèl·lula.

Els crioprotectors intracel·lulars que s'utilitzen són molècules petites que travessen fàcilment les membranes cel·lulars.

Sembla que hi ha una interacció entre el tipus de crioprotector que s'utilitza i l'estadi de desenvolupament de l'embrió, ja que la permeabilitat de les membranes al crioprotector podria variar segons l'estadi de l'embrió i, per tant, estadis diferents podrien demanar agents crioprotectors diferents. En general, els crioprotectors més utilitzats i els estadis en què s'utilitzen són:

Estadi	Crioprotector
2 pronúclis	1.2 PROH (1.2 propanodiol)
2 cèl·lules	
4 cèl·lules	
8 cèl·lules	DMSO (Dimetilsulfòxid)
Mòrula	Glicerol
Blastòcit	

Els crioprotectors intracel·lulars poden utilitzar-se sols o acompanyats de crioprotectors extracel·lulars.

Els crioprotectors extracel·lulars són, normalment, molècules grans que no travessen les membranes citoplasmàtiques i que produeixen un efece osmòtic que ajuda la deshidratació de la cèl·lula. Els més emprats són la sacarosa i el rovell d'ou.

En el nostre centre ens iniciàrem en la tècnica de congelació d'embrions el novembre de 1986 utilitzant embrions de ratolí. La tècnica utilitzada per a la congelació d'embrions de ratolí (Menéndez i col., 1987) s'assembla a la que utilitzem a hores d'ara per a la congelació d'embrions humans. Els embrions es congelaven en l'estadi de mòrula i s'utilitzava com a criteri de supervivència que aconseguissin l'estadi de blastòcit expandit.

Quan s'inicià la congelació en embrions humans, la taxa de supervivència d'embrions de ratolí obtinguda era superior al 75 % (Menéndez i col., 1987).

La congelació d'embrions humans la realitzem en l'estadi de 2 pronúclis, seguint la tècnica que va descriure Lassalle (Lassalle i col., 1985), que utilitza com a medis crioprotectors el 1,2-PROH i la sacarosa.

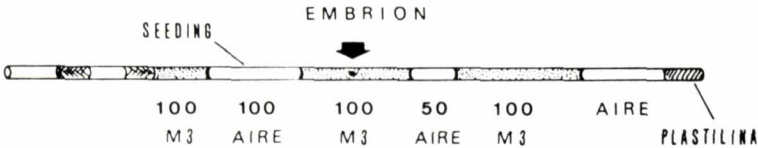


Figura 1. Esquema d'una palleta envasada.

En la tècnica de congelació s'utilitzen 3 medis de cultiu diferents:

M1 : Dulbeco's 20 % sèrum matern inactivitat (SM)

M2 : Dulbeco's 20 % SM 1'5 M PROH $t = 15$ min.

M3 : Dulbeco's 20 % SM 1'5 M PROH 0,1 M sacarosa.

Els embrions s'envasen en M3 utilitzant palletes de clorur de polivinil de 0,5 ml esterilitzades amb òxid d'etilè. En l'envasat es van alternant fraccions de medi amb fraccions d'aire (Fig. 1).

L'equip de congelació que s'utilitza consta d'un Planer Kryo 10-1'7 amb *autoseeder* AS-ID alimentat amb nitrogen líquid (N_2L).

El programa té una durada total de 115 minuts i consta de 7 rampes:

1a rampa : A-2°C x min. de T fins a -5°C

2a rampa : A-2°C x min. de -5°C fins a -7°C

3a rampa : A 0°C x min. durant 4 min.

4a rampa : A 0°C x min. durant 5 min. *SEEDING*

5a rampa : A 0°C x min. durant 11 min.

6a rampa : A-0'3°C x min. de -7°C fins a -30°C

7a rampa : A-50°C x min. de -30°C fins a -80°C

Acabat el programa es submergeixen les palletes en N_2L (-196'5°C) on s'emmagatzemen.

Descongelació

Es manté la palleta a temperatura ambient durant 40 seg. i seguidament se submergeix a bany maria a 30°C fins a la descongelació total.

Es descarrega la palleta damunt una placa de Petri, es localitza l'embrió i s'inicien una sèrie de passos a fi i efecte d'eliminar el crioprotector de l'interior de la cèl·lula. Els medis que s'utilitzen en la descongelació són:

M4 : Dulbeco's 20 % SM 1M PROH 0'2 M sacarosa $t = 5$ min.

M5 : Dulbeco's 20 % SM 0'5 PROH 0'2 M sacarosa $t = 5$ min.

M6 : Dulbeco's 20 % SM 0'2 M sacarosa $t = 5$ min.

M1 : Dulbeco's 20 % SM

Finalment es deixen els embrions incubant en medi Ham F - 10 amb suplement d'un 15 % de sèrum matern a 37°C en atmosfera del 5 % CO_2 i 98 % humitat.

La supervivència es determina transcorregudes 24 hores, observant si s'ha produït divisió cel·lular. Si la supervivència és positiva aleshores es transfereix a l'úter matern.

A la fig. 2 es pot veure l'aspecte que presentava un dels embrions a l'hora de ser congelat, immediatament després de la descongelació i després de 24 h. d'incubació en Ham F-10.

Resultats

Amb aquesta tècnica es van congelar 30 embrions dels quals se'n descongelaren 13. D'aquests, 12 presentaren divisió cel·lular després de 24 h. d'incubació, la qual cosa dóna una taxa de supervivència embrionària del 92,3 %.

Dels 12 embrions que van dividir-se, 7 (58,3 %) es trobaven en l'estadi de dues cèl·lules al moment de la TE. Els altres 5 (41,7 %) presentaven més de dues cèl·lules. Aquests embrions es van transferir a vuit dones i es produí l'embaràs que a hores d'ara es troba en mesos de gestació i evoluciona favorablement.

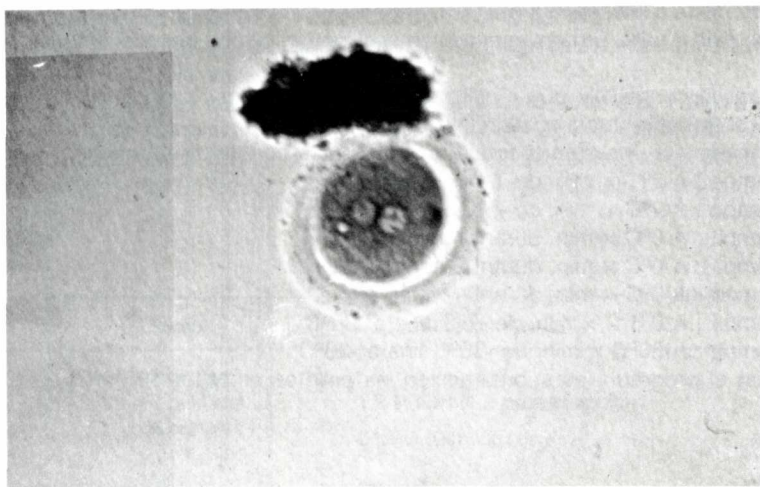
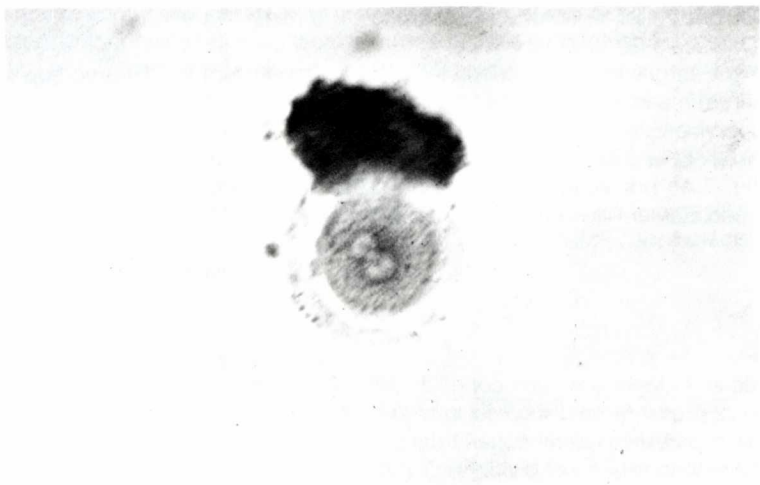
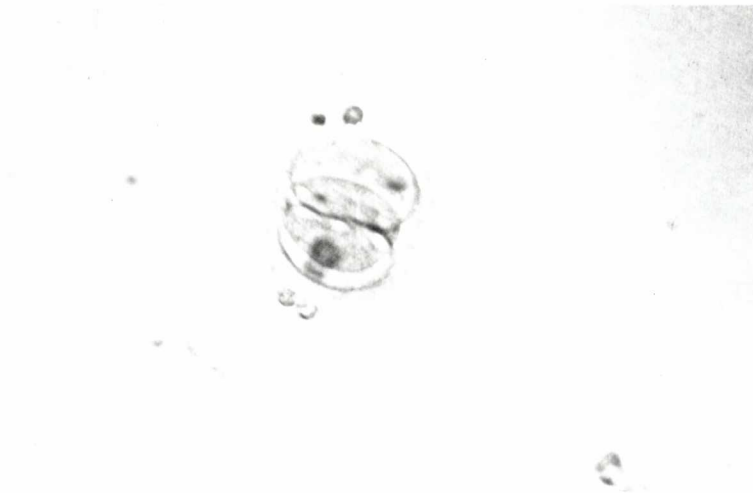


Figura 2. 2 a) Embrió en l'estadi de 2PN abans de ser congelat.



2 b) Aspecte que presenta aquest mateix embrió quan ha estat descongelat.



3 c) Embrió en l'estadi de tres cèl·lules després de 24 h. d'incubació, després de la descongelació.

El 83,3 % dels embrions que es van dividir presentava un bon aspecte amb blastòmers regulars i sense fragments citoplasmàtics.

Discussió

La FIV-TE avui en dia exigeix, donat el gran nombre d'embrions que se n'obté, disposar de tècniques de congelació d'embrions. La donació d'òvuls i d'embrions es fa, en la pràctica, molt difícil si no es disposa de la tècnica de congelació i emmagatzematge d'embrions.

L'entrenament previ amb embrions de ratolí ens ha permès d'obtenir, ja de bon començament, taxes elevades de supervivència embrionària (> 90 %). La substitució del tampó PB1 pel tampó Dulbecco's, simplifica i economitza la tècnica de congelació ja que en el nostre centre utilitzem Dulbecco's com a diluent del líquid fol·licular.

La congelació en estadi de dos pronúclis (pre-zigot per a alguns) permet, segons la tècnica que hem descrit, una alta taxa de supervivència, comprovada per la divisió cel·lular observada després de 24 hores d'incubació.

Bibliografia

- LASSALLE, B. et al. *Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol*. Fertility and sterility. Vol. 44, núm. 5. Nov. 1985.
- TESTART, J. et al. *High pregnancy rate after early human embryo freezing*. Fertility and sterility. Vol. 46, núm. 2 Agost 1986.
- RENARD, J.P. i BABINET, C. «High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1.2 propanediol as cryoprotectant». *The Journal of Experimental Zoology*, 230, ps. 443-446. 1984.
- MENÉNDEZ, S. et al. *Técnica de congelación de embriones de ratón*. Dins *Actas del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad*. Màlaga. Maig 1987a.
- MENÉNDEZ, S. et al. *Supervivencia de los embriones de ratón a la congelación y descongelación*. Dins *Actas del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad*. Màlaga. Maig 1987b.