

Congelación de ovocitos para reproducción asistida: Revisión

Oocyte freezing for assisted reproduction: Overview

Marina S, Marina F, Torres PJ, Fosas N, Martín P, Alcolea R, Pérez N, Fernández S, Arnedo N, Jové I, Hochman M, Suñol J.

Instituto de Reproducción CEFER. Barcelona

Resumen

La utilidad de la congelación de ovocitos es clara permite conservar los propios gametos a mujeres que se van a someter a cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, o a mujer premenopausica. En la donación de óvulos se facilitaría todo el proceso sin precisar fecundar los óvulos donados. En las parejas de FIV reduciría los problemas ético-legales de los embriones congelados. El óvulo al ser la célula más grande del organismo, tiene un gran contenido en agua y en estadio de metafase II tiene los cromosomas dispersos pues carece de núcleo. El huso es sensible a los descensos térmicos y su alteración induce aneuploidías. La congelación produce, así mismo, endurecimiento de la zona pelúcida y eliminación precoz de los gránulos corticales. Estas alteraciones ovocitarias dificultan la fecundación mediante inseminación, y si se produce, se facilita la polispermia. El uso de crioprotectores a concentraciones adecuadas en un proceso de congelación lento y descongelación rápida unido a la práctica de ICSI ha propiciado la resolución de los problemas planteados en la congelación de ovocitos en metafase II. A partir de 1997 se suceden las publicaciones de niños nacidos sanos de ovocitos congelados-descongelados. La Ley 35/1988 ponía reparos a la congelación ovocitaria con fines reproductivos hasta que no se demostrase la viabilidad de dichos ovocitos al descongelarse. Consideramos que ha llegado el momento de aplicar la criopreservación de ovocitos. El Instituto de Reproducción CEFER ha conseguido el primer embarazo clínico con ovocitos criopreservados. Se ha seguido un protocolo aprobado por el Comité Ético y de Investigación.

Palabras clave: Congelación de ovocitos. Microinyección espermática. Gestación. Congelación de gametos.

Recibido: 15-12-01

Aceptado: 30-1-02

Correspondencia: Dr. Simón Marina

Instituto de Reproducción CEFER

Marquesa de Vilallonga 12

08017 Barcelona

E mail: info@institutocefer.com

Summary

Freezing oocytes is one way to preserve the eggs of women who will be operated on or will undergo radiotherapy and/or chemotherapy, as well as those of premenopausal women. In egg donations, the entire process could be facilitated without making it necessary to fertilise the donated eggs. In couples requiring IVF, freezing the oocytes would reduce the ethical-legal problems of frozen embryos. Because the egg is the organism's largest cell, it contains a great deal of water and in the metaphase II stage its chromosomes are dispersed due to the lack of a nucleus. The spindle is sensitive to drops in temperature and any alteration of the spindle can produce aneuploidies. Freezing also makes the zona pellucida harder and leads to premature elimination of the cortical granules. These alterations in the oocyte make fertilisation through insemination more difficult and, if fertilisation does occur, polyspermy is a more common outcome. The use of suitable concentrations of cryoprotectants in a process of slow freezing and rapid thawing, followed by ICSI, has solved the problems arising from freezing oocytes in metaphase II. Starting in 1997, the publication of articles announcing births of healthy children using frozen-thawed oocytes became more frequent. Spanish Law 35/1988 puts restrictions on freezing oocytes for reproductive purposes until the viability of these oocytes after thawing can be proven. We believe the time has come to apply cryopreservation to oocytes. The Instituto de Reproducción CEFER has achieved the first clinical pregnancy with cryopreserved oocytes following a protocol approved by the Ethics and Research Committee.

Key words: Oocyte freezing. Intracytoplasmic sperm injection. Pregnancy. Gamete freezing.

INTRODUCCIÓN

La crioconservación (conservación por el frío) de células humanas es una tecnología ampliamente utilizada en medicina. En el campo de la reproducción hace casi 50 años que se vienen crioconservando espermatozoides a nivel mundial; y en España desde 1977 (32) El uso de espermatozoides crioconservados es muy frecuente en centros médicos que efectúan Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) La crioconservación espermática supone una autonomía en relación al lugar y tiempo, el aquí y ahora, que exige el semen fresco. La doble utilidad que supone la crioconservación espermática es incuestionable: a) permite al hombre conservar su fertilidad antes de recibir tratamientos que pueden provocar esterilidad (radioterapia, quimioterapia y cirugía); b) en el caso de donación de semen permite que todo el proceso sea más fácil, fiable y seguro; y cumpla los requisitos legales.

La congelación de embriones es un mal menor lleno de problemas prácticos, éticos y legales. Y es que el embrión es cosa de dos, de una pareja. A pesar de estas consideraciones disponemos de Banco de Semen y Banco de Embriones pero no de Banco de Ovocitos (óvulos) La situación ideal es disponer de Bancos de Gametos (espermatozoides y ovocitos) y formar los embriones cuando se precisen y en el número que se precisen. Poner en marcha técnicas de congelación de ovocitos es una necesidad cada día más acuciante dada la problemática a nivel médico,

ético, legal y práctico, que está planteando la congelación embrionaria; problemática que solo se solucionará con la congelación de ovocitos. La crioconservación por debajo de -130°C permite virtualmente una conservación indefinida.

CONGELACIÓN DE OVOCITOS PARA USO PROPIO

Actualmente no se puede conservar la fertilidad de una mujer abocada a ser estéril por tratamiento médico. A diferencia de los espermatozoides, los ovocitos no se están congelando en España para su uso en Reproducción Asistida. Las mujeres que van a ser sometidas a radioterapia, quimioterapia u ovariectomía bilateral se beneficiarían de la congelación de ovocito pero en la actualidad no pueden crioconservarlos. Otro grupo de mujeres que se pueden beneficiar de la congelación de ovocitos son las mujeres fértiles hoy, que desean posponer la maternidad para años venideros, en los que, de manera fisiológica, ya no serán fértiles.

Sin la congelación de ovocitos disponible, la alternativa es hacer un ciclo de fecundación in vitro (FIV) y congelar los embriones. Ello requiere: 1) estimulación ovárica con hormonas gonadotróficas para que maduren los óvulos en los folículos ováricos. En algunas neoplasias hormonodependientes este tratamiento está contraindicado. 2) punción y aspiración de los folículos ováricos que se han desarrollado con

el tratamiento hormonal. La punción se hace por vía vaginal guiada por ecografía y bajo anestesia. 3) que la mujer tenga pareja masculina que aporte el semen. En caso contrario habría que fecundar los ovocitos con semen de donante anónimo.

Esta situación conlleva, en la practica, a que mujeres necesitadas de los tratamientos médicos citados pierdan su fertilidad y formen un colectivo tributario en el futuro de recibir óvulos donados. La congelación de ovocitos inmaduros no precisa que la mujer reciba tratamiento hormonal, pero requiere la maduración in vitro pre o post congelación. La congelación de ovocitos, tanto inmaduros como maduros, no exige fecundarlos y por tanto no es preciso que la mujer tenga pareja masculina con la que proyecte formar una familia.

CONGELACIÓN DE OVOCITOS PARA DONACIÓN

La donación de óvulos por parte de mujeres no pacientes es una práctica cada día más frecuente en nuestro medio. Presenta los siguientes problemas prácticos: 1) los ovocitos se han de fecundar cuando se extraen de los folículos ováricos. Ello obliga a tener una pareja receptora idónea o rechazar la donación. El proceso de donación exige, si se hace correctamente, que la donante tenga disponibilidad de tiempo para venir cada día al centro médico durante unas dos semanas seguidas. A la donante se le debe dar facilidad para que haga la donación el mes que le venga mejor a ella. En caso contrario suele renunciar a la donación de ovocitos. 2) los ovocitos se fecundan con espermatozoides de la pareja de la mujer estéril, la receptora. No es infrecuente que queden embriones que la pareja no desea utilizarlos por haber conseguido el o los hijos deseados. La congelación de ovocitos permitiría ir fecundándolos a medida que fuese preciso. 3) parejas receptoras con características fenotípicas poco frecuentes en nuestro medio: de otra raza, de grupo sanguíneo y Rh poco frecuente, pelirrojos, etc, deben aceptar donante sin las características idóneas; o esperar a que se consiga una donante con características similares.

Otro colectivo de mujeres en que se utiliza la congelación de ovocitos son las pacientes que se hacen FIV. Habitualmente se fecundan todos los ovocitos con espermatozoides del marido; y donan los embriones que no van a utilizar. La congelación de ovocitos permite fecundar solo los ovocitos necesarios y congelar los restantes. Se reducen los embriones sobrantes lo que evita los problemas éticos y legales actua-

les. La mujer puede decidir libremente qué hacer con sus ovocitos congelados: destruirlos; autorizar a que se investigue con ellos; o donarlos para que otra mujer sea madre. No hay en ello ningún problema ético o legal. Hay parejas que rehúsan la congelación de embriones (64)

Otra situación, no por poco frecuente menos importante, es la imposibilidad del hombre para aportar el semen el día de la extracción de ovocitos. Un accidente, un problema de tráfico, un estado de ansiedad que le impide eyacular son algunas circunstancias. En estos casos actualmente los ovocitos se tiran al no poder fecundarlos ni congelarlos.

CARACTERÍSTICAS DEL OVOCITO

El ovocito es una célula grande y sensiblemente esférica. El diámetro de un ovocito humano maduro, en metafase II (MII) es de 130 micras. Muestra el primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino. Es la célula aislada más grande del organismo. La relación superficie / volumen es 3/4 del radio. Es decir que a mayor radio la relación de la superficie de la membrana celular respecto a su volumen es menor. Célula con mayor volumen contiene más agua y, proporcionalmente, menos superficie para salir el agua y entrar las sustancias crioprotectoras penetrantes. Otra característica a subrayar en el ovocito MII es que los componentes subcelulares son muy sensibles a la temperatura (31); osmolaridad e iones (37,58) En el ovocito en MII los cromosomas y los microtúbulos del huso están libres en el citoplasma; y las vesículas con los gránulos corticales están localizadas próximas a la membrana plasmática u ovolema. El huso meiótico se forma por polimerización de la proteína denominada tubulina cuando alcanza una concentración crítica. La polimerización de la tubulina da lugar a los microtúbulos que constituyen el huso. Una adecuada formación del huso meiótico es precisa para que el alineamiento y la segregación cromosómica sean correctos y la célula resultante sea euploide. Los ovocitos humanos maduros presentan una gran heterogeneidad en la distribución y organización de las organelas citoplasmáticas y en la permeabilidad de la membrana al agua (15). Están rodeados por las células de la corona y más externamente por las células granulosas del cúmulo. El ovocito inmaduro, con vesícula germinal visible, es decir, en profase I (PI) tiene los cromosomas condensados y localizados dentro del núcleo o vesícula germinal. Están protegidos por la membrana nuclear a diferencia de los cromosomas del ovocito en MII. En el ovocito inmaduro no se ha formado el

huso meiótico. La congelación de ovocitos en PI, previene la alteración del huso y la aneuploidía (14) El inconveniente que presenta la congelación de ovocitos inmaduros es que han de madurar in vitro. Tiene sin embargo la enorme ventaja de no precisar estimulación gonadotrófica, en casos de congelación de ovocitos pre radioterapia, quimioterapia u ovariectomía bilateral.

CAMBIOS DEL OVOCITO DURANTE LA CONGELACIÓN

El agua es el disolvente universal de los seres vivos. El agua pura tiene un punto de equilibrio de congelación a 0°C. Los solutos a las concentraciones que se dan en el organismo disminuyen el punto de congelación en unos grados. Cuando una célula es enfriada a temperatura por debajo de su punto de equilibrio de congelación, se forma hielo que puede dañar o matar a la célula. El ovocito que se congela demasiado rápido sufre la formación de cristales de hielo en su citoplasma que pueden dañar las organelas. La congelación demasiado lenta produce al deshidratarse un aumento en la concentración de solutos nociva para el ovocito (33, 27) Existe además el riesgo de daño debido al descenso térmico(35). El trasiego de agua y sustancias crioprotectoras a través de la membrana plasmática es el principal factor que controla los efectos de la congelación. A su vez la mayor o menor facilidad de paso del agua y los crioprotectores, a través de la membrana plasmática, depende de la composición de la membrana, de su permeabilidad en función de la temperatura (34); de la relación superficie / volumen (30, 34); y de la diferencia de presión osmótica a los dos lados del ovolema (57) La congelación puede afectar la integridad de las fibras del huso (44) y los gránulos corticales (65) La despolimerización de los microtúbulos del huso puede inducir aneuploidias (7); la liberación prematura de los gránulos corticales (63) facilita la polispermia. La zona pelúcida se vuelve más dura y se reduce la tasa de fertilización (13, 28) El ovocito se activa y puede dividirse por partenogénesis; activación inducida por oscilaciones del calcio (3)

Durante la congelación se producen cambios de volumen en el ovocito debidos a la diferente presión osmótica entre la solución intra y extracelular (4, 39) Estos cambios pueden afectar la integridad del ovolema (22); y de las organelas subcelulares (55, 36) Conocer la tolerancia límite a las variaciones osmóticas y del volumen ovocitario (se arruga al deshidratarse y se hincha al rehidratarse) ayudará a utilizar

sustancias crioprotectoras a una concentración óptima. (43) Los cambios de volumen del ovocito no deben sobrepasar en $\pm 30\%$ (38)

ACCIÓN DE LAS SUSTANCIAS CRIOPROTECTORAS

Las sustancias crioprotectoras se dividen en penetrantes, es decir, que entran en la célula, en este caso el ovocito; y no penetrantes que permanecen extracelulares. Como crioprotectores penetrantes se han utilizado básicamente dimetilsulfoxido (DMSO); 1,2 propanodiol (PROH), glicerol, propilen-glicol y etilen-glicol. En la congelación de ovocitos humanos se utiliza principalmente el PROH (16).

El crioprotector no penetrante más ampliamente utilizado en la congelación de ovocitos, es la sacarosa. Se ha utilizado también glucosa, ficoll y lipoproteínas. Son moléculas grandes que no atraviesan el ovolema.

La solución de equilibración del ovocito más habitualmente usada para congelar ovocitos humanos contiene PROH a concentración 1,5 M. (51) mucho más alta que otros componentes del medio o solución de equilibración y de carga. Ello permite que, por ósmosis, el crioprotector entre en la célula. El agua sale fácilmente del ovocito y el crioprotector entra. El ovocito humano es más permeable al agua que al PROH (42) El ovocito equilibra su desnivel osmótico producido por la alta concentración de crioprotector penetrante, al salir agua y entrar crioprotector. En este contexto equilibrar el ovocito significa igualar la concentración de crioprotector penetrante intra y extracelular. La equilibración del ovocito se hace a temperatura ambiente durante 10 minutos, tiempo considerado idóneo (1) Pasado este tiempo el ovocito se introduce en la solución de carga o de congelación que se obtiene añadiendo sacarosa (0,2M) a la solución de equilibración (51) Con concentración más alta de sacarosa (0,3M) se obtienen mejores resultados (16) En esta solución de carga con 0,2M de sacarosa se mantiene el ovocito de 10,5 a 15 minutos. Si el tiempo de exposición del ovocito a la solución de carga es menor de 10 minutos los resultados son inferiores. A los 15 minutos el diámetro del ovocito se ha reducido sobre un 20% (16) El tiempo de exposición a la solución de carga es solo de 30 segundos cuando la concentración de sacarosa es del 0,3 M. El crioprotector disminuye el punto de congelación de la solución y evita la exposición del ovocito a altas concentraciones de electrolitos intra y extracelular ya que se une a los electrolitos y en parte sustituye al agua (52)

El crioprotector no penetrante, que se mantiene extracelular, aumenta la concentración extracelular de solutos y por tanto aumenta la presión osmótica extracelular en relación con la presión osmótica intracelular. Este desnivel osmótico induce la salida del agua intracelular al exterior; el ovocito se deshidrata y la alta concentración de solutos extracelulares se diluye hasta que el agua extracelular se congela y se convierte en metabólicamente inactiva (57) La célula se arruga, disminuye su volumen y el riesgo de formación de cristales de hielo intracelulares se reduce. Las sustancias crioprotectoras pueden tener efectos adversos sobre el ovocito en función de la temperatura, concentración y tiempo de exposición (17) Si estos parámetros no se ajustan de manera apropiada se producirán cambios en el volumen del ovocito; lo podrán dañar o quedará más sensible al descenso térmico.

UTILLAJE PARA CONGELAR OVOCITOS

Para el descenso térmico controlado se utiliza el biocongelador vertical Kryo 10 serie III (Planer Product Ltd) con una temperatura en la cámara de 23°C. Es el mismo biocongelador que utilizamos para congelar embriones. Los ovocitos se almacenan en el mismo tipo de pajuelas que usamos para congelar espermatozoides y embriones. Todo el utillaje para identificar, denudar, clasificar y cultivar el ovocito es el mismo que se utiliza en un laboratorio de FIV en el que se efectúa ICSI y congelación de embriones.

CONGELACIÓN DE OVOCITOS

Para cada célula hay un ritmo óptimo de enfriamiento. El ritmo de congelación condiciona el ritmo de descongelación. Al llegar a entre -5°C y -15°C se forma hielo extracelular; este hielo no puede entrar en la célula y se previene la formación de un núcleo de hielo en el interior de la célula. El agua sale a través de la membrana plasmática del interior al exterior y se congela fuera de la célula. La célula se deshidrata. Esto sucede por la mayor presión osmótica extracelular que el agua en su salida de la célula tiende a equilibrar con la presión osmótica intracelular. La deshidratación del ovocito reduce el riesgo de formación de cristales de hielo intracelulares que son nocivos. Si el descenso térmico es demasiado rápido, no hay tiempo suficiente para que salga el agua precisa del ovocito y se formarán cristales de hielo dentro de la célula (19) La inducción manual del seeding (formación del hielo extracelular) se hace tocando la pared del recipiente donde están los ovocitos con la so-

lución crioprotectora, con un objeto congelado a -196°C, temperatura del nitrógeno líquido. Es una fase muy importante en la congelación de ovocitos humanos pues inicia su deshidratación (57) La congelación suficientemente lenta permite que casi toda el agua disponible pueda salir de la célula que no se dañará al sumergirla en nitrógeno líquido (57) Finalizado el proceso de congelación las pajuelas se introducen en el nitrógeno líquido del Banco de Ovocitos.

DESCONGELACIÓN DE OVOCITOS

El ritmo de descongelación es también crítico en el proceso de crioconservación ovocitario. El problema que puede suceder es la recrystalización con formación de cristales de hielo intracelulares que dañan al ovocito. Si al congelar el ovocito ha quedado algo de agua intracelular, se forman pequeños cristales de hielo al introducir el ovocito en el nitrógeno líquido. Estos cristales de hielo intracelular actúan como núcleo de cristalización; crecerán en tamaño si el ritmo de descongelación es lento y el ovocito se dañará. El proceso de descongelación debe ser muy rápido (casi 275°C/minuto), para permitir una rápida dispersión de los cristales de hielo intracelulares. El hielo extracelular se derrite y el agua líquida resultante entra en el ovocito y lo rehidrata (19)

ELIMINACIÓN DE LOS CRIOPROTECTORES

Cuando el ovocito se descongela contiene alta concentración de crioprotector. Al colocarlo en solución con menor concentración de crioprotector el agua entra en la célula para diluir el crioprotector, que a su vez sale de la célula. Pero el agua entra más rápida que el crioprotector sale, lo que provoca hinchazón del ovocito que puede incluso reventar. Este riesgo de hinchazón del ovocito se reduce eliminando por etapas los crioprotectores a base de pases del ovocito por soluciones decrecientes de crioprotectores. La presencia de alta concentración de crioprotector no penetrante como la sacarosa sirve de contrapunto a la concentración de crioprotector penetrante intracelular; reduce el choque osmótico y controla el flujo de agua al interior de la célula (57)

VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS OVOCITOS

La viabilidad del ovocito descongelado para utilizarlo en Reproducción Asistida se puede valorar con

los siguientes métodos: 1) observación al microscopio tras la descongelación e incubación. 2) normalidad de la fecundación tras la microinyección espermática (ICSI) 3) división y desarrollo in vitro. 4) estudio de cromosomas del embrión antes de transferirlo al útero. 5) amniocentesis para estudio de cromosomas del feto una vez conseguida la gestación. 6) revisión pediátrica del recién nacido.

Los puntos 1, 2 y 3 se hacen en todos los casos de FIV de manera rutinaria con ovocitos no congelados y lógicamente se practicaría la misma valoración con ovocitos congelados y descongelados. El punto 4 no está justificado ni sería posible exigirlo en la práctica por las siguientes consideraciones: a) a la luz de los datos actuales el riesgo de patología fetal debida a la práctica de la congelación - descongelación del ovocito es un riesgo no valorable. Es explicable que alguno lo proponga por ser una técnica relativamente novedosa y por las observaciones de alteraciones embrionarias, básicamente en ovocitos de ratón, publicadas en la década de los años ochenta en que entra en vigencia la Ley 35/88. b) el estudio de cromosomas en el embrión preimplantatorio, antes de transferirlo al útero, requiere extraerle una o dos células para el estudio de cromosomas, no exenta de riesgo. c) en el estado técnico actual solo se pueden estudiar algunos cromosomas, el 13, 16, 18, 21, 22, X e Y. No da información sobre los otros 17 pares de cromosomas. d) el elevado coste de este estudio habría que sumarlo al coste de todo el proceso. e) estudios de cromosomas efectuados en ovocitos humanos congelados-descongelados obtuvieron resultados normales (20, 12) Se hizo sólo como estudio no en Reproducción Asistida. Como plus de seguridad y prudencia consideramos preciso proponer y aconsejar a las mujeres gestantes de ovocitos congelados que se hagan la amniocentesis y estudio cromosómico fetal. Así se hizo cuando se comenzó a utilizar la técnica de FIV y la de ICSI, es decir, la introducción de un espermatozoide en cada ovocito.

VIABILIDAD DE LOS OVOCITOS DESCONGELADOS

En la viabilidad de la crioconservación de ovocitos podemos considerar dos aspectos:

- 1) Porcentaje de ovocitos que sobreviven al descongelarlos, se fecundan, se dividen y una vez transferidos al útero se implantan y producen gestación. Bajo este prisma la técnica de crioconservación ha dado resultados similares a los que se obtienen en la congelación de embriones.

Pero este aspecto no es el espíritu de la Ley 35/88. La Ley no prohíbe la inseminación artificial porque se consiga sobre un 15% de gestaciones por ciclo y falle en el 85% de casos. No es ese el meollo sino el aspecto.

- 2) Que el niño nazca sano. Que no nazcan niños enfermos en una tasa superior a la que le corresponda a esa pareja si consiguiese un hijo sin haber congelado los ovocitos, con ovocitos frescos. Es decir que la técnica de congelación de ovocitos utilizada no suponga por sí misma un incremento de riesgo de patología fetal. En la amplia literatura revisada no hemos encontrado ningún caso de niño nacido enfermo debido a que el embrión se formó al fecundarse ovocitos congelados. La experiencia acumulada en la congelación-descongelación de ovocitos; y los niños nacidos, todos sanos, es una demostración de la viabilidad de los ovocitos descongelados, requisito exigido por la Ley 35/88 en su artículo 11.2.

EXPERIENCIA EN CLÍNICA HUMANA

Publicaciones de la década de los ochenta sugirieron que la congelación y descongelación de ovocitos humanos maduros podía producir alteraciones en el huso meiótico y en los cromosomas (31, 53, 54) También se describió, por mor de la congelación-descongelación ovocitaria, rigidez de la zona pelúcida (24, 25, 60) y reacción prematura de los gránulos corticales (55) Estas alteraciones descritas supusieron un freno al desarrollo de la congelación de ovocitos humanos principalmente en España que por aquellas fechas promulgó una Ley sobre Técnicas de Reproducción Asistida. (Ley 35/88)

Dos cambios técnicos básicos han conseguido la viabilidad de los ovocitos descongelados. a) las alteraciones del huso meiótico y de los cromosomas observados al congelar ovocitos humanos en la década de los ochenta, se han resuelto introduciendo cambios en la composición del medio crioprotector y en el ritmo de congelación-descongelación (5, 12, 16, 51) b) la técnica de ICSI, (40), hoy día ampliamente utilizada, ha permitido soslayar las otras alteraciones observadas al congelar y descongelar ovocitos humanos: rigidez de la zona pelúcida y eliminación prematura de los gránulos corticales. Con la ICSI se obvia la dureza adquirida por la zona pelúcida en el proceso de congelación - descongelación; y se evita la polispermia (entrada en el ovocito de más de un espermatozoide), que se produce en una inseminación de un ovocito maduro que ha eliminado prematuramente los

gránulos corticales. Recordemos que los gránulos corticales del ovocito maduro, en metafase II, se eliminan una vez ha entrado el primer espermatozoide. La función de los gránulos corticales es bloquear la zona pelúcida impidiendo la entrada de otro espermatozoide. La ICSI no se empieza a aplicar hasta 1992. El primer nacimiento de ovocito descongelado fecundado, mediante ICSI se consigue cinco años después (46), y la Ley de Técnicas de Reproducción Asistida entró en vigor en 1988.

NIÑOS NACIDOS DE OVOCITOS CONGELADOS Y DESCONGELADOS

Desde mediados de la década de los noventa se han ido sucediendo las publicaciones de gestaciones conseguidas con ovocitos congelados-descongelados (2, 6, 8, 16, 29, 45, 47-51, 56, 59, 61, 62, 68, 70) Todos los niños nacidos son sanos.

La tasa de sobrevivencia ovocitaria alcanzada es superior al 80% (16) Esta tasa es similar a la tasa de sobrevivencia que se obtiene con la técnica de congelación de embriones autorizada por la Ley 35/88 (67) Los cambios en la técnica de congelación - descongelación junto al empleo de la ICSI una vez descongelados los ovocitos, ha cambiado drásticamente la situación. De una técnica en experimentación se ha convertido en una técnica de uso clínico.

VITRIFICACIÓN

Otro sistema de criopreservar los ovocitos es la vitrificación. La vitrificación es la transición de una solución acuosa del estado líquido al estado vítreo (sólido) sin pasar por el estado sólido cristalino (18) Para conseguir la vitrificación del ovocito, el medio crioprotector debe tener una concentración alta (≈ 6 M) La vitrificación tiene la ventaja de que no se precisa el costoso equipo necesario para la criopreservación de ovocitos con la técnica de "congelación lenta - descongelación rápida" descrita. La congelación ultrarrápida que se consigue en la vitrificación puede ayudar a criopreservar células muy sensibles a bajas temperaturas (35) En la vitrificación los ovocitos se guardan en pajuelas afinadas y abiertas; o en rejillas de cobre utilizadas en microscopía electrónica. Se sumergen directamente en nitrógeno líquido. El descenso térmico es muy rápido, el agua intracelular no tiene tiempo para salir. El agua y los solutos de la célula pasan del estado líquido a sólido (vítreo) La célula no se deshidrata.

En 1995 Hunter consigue fecundar ovocitos preovulatorios vitrificados y descongelados pero no observa división embrionaria (23) En 1999, Hong a partir de ovocitos vitrificados obtiene embriones que se dividen y llegan a blastocisto (21) Ovocitos inmaduros vitrificados madurados in vitro tras la descongelación, ó madurados in vitro antes de vitrificarlos sobreviven, se fecundan y se dividen (10, 66) Llegan a blastocisto y no presentan aneuploidías (9, 11) A partir de ovocitos inmaduros vitrificados y madurados in vitro tras descongelarlos; ó madurados in vitro y vitrificados no se ha conseguido ningún nacimiento. En 1999 Kuleshova publica el nacimiento de una niña sana conseguida a partir de ovocitos maduros vitrificados. La fecundación tras la descongelación de los ovocitos la efectuó con la técnica de ICSI (29). Al año siguiente Yoon publica nacimientos de niños sanos a partir de ovocitos maduros vitrificados y fecundados también con ICSI (69) La solución de vitrificación más empleada contiene un crioprotector penetrante, etilen-glicol, que entra con facilidad en el ovocito; y un crioprotector no penetrante que se mantiene extracelular, la sacarosa. El tiempo de equilibración del ovocito o de exposición a la solución vitrificadora antes de vitrificarse es breve, de 20 a 30 segundos. Se hace a temperatura ambiente. Se usa nitrógeno líquido, cuya temperatura es de -196°C . La descongelación se hace en varias fases. Se obtienen mejores resultados en cuanto a división de los embriones si la duración de cada fase es más corta, 2'5 versus 5 minutos (21) La vitrificación es una técnica de criopreservación válida pero con la que hay todavía una corta experiencia y no vamos a extendernos más en ella.

ASPECTOS ÉTICOS

Criopreservar ovocitos humanos igual que espermatozoides, sangre, medula ósea, etc., no solo no supone ningún problema ético sino que son técnicas medicas loables. Conservar algo valioso como células humanas siempre es bueno. La congelación de ovocitos viene a sustituir en gran medida a la congelación de embriones que no es tan ampliamente aceptada.

ASPECTOS LEGALES

Efectuada una revisión exhaustiva de las leyes, decretos y jurisprudencia, en relación con la congelación de ovocitos solo hemos encontrado dos artículos de la Ley 35/1988 sobre Técnicas de Reproducción

Asistida, del 22 de noviembre (BOE nº 282 del 24 de noviembre de 1988) El artículo 14.2 textualmente dice: "Se autoriza la investigación dirigida a perfeccionar las técnicas de obtención y maduración de los ovocitos, así como de crioconservación de óvulos". Es evidente que la congelación de ovocitos es, sin duda alguna, legal. El texto del artículo 11.2 dice: "No se autorizará la crioconservación de óvulos con fines de Reproducción Asistida, en tanto no haya suficientes garantías sobre la viabilidad de los óvulos después de su descongelación". La Ley 35/88 en este artículo no prohíbe el uso de ovocitos congelados para Reproducción Asistida pero tampoco lo permite en el momento en que se promulga la Ley. Lo autoriza cuando "haya suficientes garantías de la viabilidad de los óvulos después de su congelación". No hace referencia la Ley a ninguna autoridad, que deba de pronunciarse sobre este punto de la "viabilidad de óvulos descongelados". Ni exige ninguna formalidad determinada. Es evidente que se puede congelar ovocitos con fines reproductivos si al descongelarlos son viables.

CONSIDERACIONES FINALES

La Ley 35/88 recogió en 1988, hace ya 13 años, en su artículo 11.2 la inquietud del uso de ovocitos congelados - descongelados ante las publicaciones citadas de aquel tiempo que comunicaban alteraciones del ovocito por la congelación. Pero el espíritu de la Ley no era poner trabas al progreso, a los avances médicos en el campo de la Reproducción Humana en general y en la congelación de ovocitos en concreto. En el apartado I se lee. "No parece haber duda de que la investigación científica y tecnológica debe continuar su expansión y progreso". En el apartado II se lee: "No pretende esta Ley abarcar todas y cada una de las múltiples implicaciones a que pueda dar lugar la utilización de estas técnicas". No se prohíbe la congelación de ovocitos. Se pospone. En la larga lista de infracciones que contiene la Ley no consta la congelación de ovocitos. En el Reino Unido ante la avalancha de nacimientos de niños sano se ha eliminado la traba legal: "The recent spate of human live births from thawed oocytes has prompted the granting of the first licence allowing the use of thawed oocytes in the UK" (41)

Hemos expuesto las situaciones clínicas en que se precisa la congelación de ovocitos y los avances técnicos en este tema sobre todo a partir de la mitad de la década de los años noventa. La revisión de la literatura de los tres últimos años evidencia que los ovo-

citados descongelados son viables con el sólido argumento del nacimiento de niños sanos sin que hayan nacido niños con enfermedad atribuible a la congelación del ovocito. La viabilidad de los ovocitos descongelados está demostrada y el reparo legal vigente en 1988 queda superado a finales del 2001. En una revisión de la legislación y normas sobre congelación de ovocitos efectuada en 37 países, solo ponen reparo legal tres: Singapur, Noruega y España. Los autores comentan que la crioconservación de ovocitos no presenta aspectos negativos desde el punto de vista médico; y que hay acuerdo entre los profesionales que la tecnología de crioconservación es mandataria en todo programa de TRA responsable (26)

P.D.: *Aplicando la técnica de congelación lenta - descongelación rápida hemos obtenido el primer embarazo clínico (latido cardiaco positivo) en el primer ciclo de FIV en que hemos utilizado ovocitos congelados-descongelados.*

BIBLIOGRAFÍA

1. **Al Hasani S, Diedrich K.:** Oocyte storage. In: Grudzinskas. J.G., Yovich, J.L.(Eds.)Gametes-The Oocyte. Cambridge University Press. Cambridge 1995; pp. 376-394
2. **Antinori S, Dani G, Selman HA et al.:** Pregnancy after sperm injection into cryopreserved human oocytes. Hum. Reprod., 13 (Abstract Bk 1)1998; pp. 157-158.
3. **Ben-Yosef D, Oron and Shalgi R.:** Low temperature and fertilization-induced Ca²⁺ changes in rat eggs. Mol. Reprod. Dev. 1995; 42:122-129
4. **Bernard A, McGrath JJ, Fuller BJ et al.:** Osmotic response of oocytes using a microscope diffusion chamber: a preliminary study comparing murine and human ova. Criobiology 1988; 25:495-501.
5. **Bernard A and Fuller BJ.:** Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. Hum. Reprod. Update 1996; 2:193-207
6. **Borini A, Baffaro MG, Bonu MA et al.:** Pregnancies after freezing and thawing. Preliminary data. Hum. Reprod. 1998; 13 (Abstract Bk 1), pp. 124 - 125.
7. **Bouquet M, Selva J and Aureoux M.:** Cryopreservation of mouse oocytes: Mutagenic effects in the embryo? Biol. Reprod 1993; 49:764-769
8. **Cha KY, Hong SW, Chung HM et al.:** Pregnancy and implantation from vitrified oocytes following in vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVF) Fertil. Steril.1999; 72 (Suppl. 1), S2.
9. **Cha KY, Chung HM, Lim JM, et al.:** Freezing immature oocytes. Molecular and Cellular Endocrinology 2000; 169: 43-47

10. **Chen SU, Lien YR, Chao K et al.:** Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil. Steril* 2000; 74: 804-808
11. **Chung HM, Hong SW, Lim JM et al.:** In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil. Steril* 2000; 73: 545-551
12. **Cobo A, Rubio C, Gerli S et al.:** Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil. Steril* 2001; 75: 354 - 360.
13. **Dumoulin JCM, Marj J, Pieters HEC et al.:** The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zona pellucida and embryos. *Fertil. Steril* 1994; 62: 793-798.
14. **Eroglu A, Toner M, Leykin L, Toth TL.:** Cytoskeleton and polyploidy after maturation, and fertilization of cryopreserved germinal vesicle-stage mouse oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet* 1988; 15:447-454
15. **Fabbri R, Porcu E, Marsella T. et al.:** Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol. Cell. Endocrinology* 2000; 169: 39 - 42.
16. **Fabbri R, Porcu E, Marsella T. et al.:** Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum. Reprod* 2001; 16: 411 - 416.
17. **Fahy GM.:** The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 23:1-13
18. **Fahy GM, McFarlane DR, Angel GA et al.:** Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21:407-426.
19. **Friedler S, Giudice L and Lamb E.:** Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril* 1988; 49: 743-764.
20. **Gook DA, Osborn SM, Bourne H et al.:** Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum. Reprod* 1994; 9: 684-691.
21. **Hong SW, Chung HM, Lim JM et al.:** Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil. Steril* 1999; 72: 142 - 6.
22. **Hotamisliligil S, Toner M and Powers Rd.:** Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod* 1996; 55:161-168
23. **Hunter JE, Fuller BJ, Bernard A et al.:** Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants; initial studies on fertilization and embryonic development. *Hum. Reprod* 1995; 10: 1184-1188
24. **Johnson MH.:** The effect on fertilization of exposure of mouse oocytes to dimethyl sulfoxide: an optimal protocol. *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer* 1989; 6: 168 - 175.
25. **Johnson MH, Pickering SJ and George MA.:** The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte. *Hum. Reprod* 1988; 3: 383 - 387.
26. **Jones HW and Cohen J.:** Iffs surveillance 98. *Fertil. Steril* 1999; 71 (suppl. 2) : 14S - 16S.
27. **Karlsson JOM, Eroglu A, Toth TL et al.:** Fertilization and development of mouse oocytes cryopreserved using a theoretically optimized protocol. *Hum. Reprod* 1996; 11: 1296-1305
28. **Kazem R, Thompson LA, Srikantharajah A et al.:** Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod* 1995; 10:2650-2654.
29. **Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C et al.:** Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum. Reprod* 1999; 14:3077 - 3079.
30. **Leibo SP.:** Water permeability and its activation energy of fertilized and un-fertilized mouse ova. *J Membr. Biol* 1980; 53:179-188
31. **Magistrini M and Szollosi D.:** Effects of cold and of isopropyl N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocyte. *Eur. J. Cell. Biol* 1980; 22: 699 - 707.
32. **Marina S.:** The first sperm bank in Spain. In: David, G., Price, W.S. (Eds.) *Human Artificial Insemination and Preservation*. Plenum Press. New York 1979; pp. 57-60
33. **Mazur P, Rall WF and Leibo SP.:** Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova: Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys* 1984; 6:197-214.
34. **Mazur P and Shneider U.:** Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys* 1986; 8:259-285
35. **Mazur P, Shneider U and Mahowald AP.:** Characteristics and kinetics of subzerochilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology* 1992; 29:39-68
36. **McWilliams RB, Gibbons WE and Leibo SP.:** Osmotic response of mouse and human ova in permeating and non-permeating solutes. (Abstract) *Cryobiology* 1991; 28:523
37. **McWilliams RB, Gibbons WE and Leibo SP.:** Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Hum. Reprod* 1995; 10:1163-1171
38. **Newton H, Pegg DE, Barrass R et al.:** Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocytes. *J. Reprod. Fertil* 1999; 117:27-33
39. **Oda K, Gibbons WE and Leibo SP.:** Osmotic shock of fertilized mouse ova. *J. Reprod. Fertil* 1992; 95:737-747.
40. **Palermo G, Joris H, Devroey P et al.:** Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340 :17 -18.

41. **Paynter SJ.**: Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum. Reprod, Update* 2000; 6: 449-456
42. **Paynter SJ, O'Neil L, Fuller BJ et al.**: Membrane permeability of human oocytes in the presence of the cryoprotectant propane-1,2-diol. *Fertil. Steril* 2001; 75: 532-538
43. **Pedro PB, Zhu SE, Makino N. et al.**: Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology* 1997; 35:150-158.
44. **Pickering SJ, Johnson MH.**: The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod* 1987; 2: 207-216
45. **Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M et al.**: Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil. Steril* 1998; 69: 555 - 557.
46. **Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R et al.**: Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil. Steril* 1997; 68: 724 - 730.
47. **Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R et al.**: Birth of six healthy children after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Hum. Reprod* 1998; 13 (Abstract Book: 124)
48. **Porcu E, Fabbri R, Ciotti PM et al.**: Cycles of human oocyte cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection : results of 112 cycles. *Fertil. Steril* 1999; 72 (Suppl. 1), S2.
49. **Porcu E, Fabbri R, Petracci S et al.**: Ongoing pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of testicular spermatozoa into cryopreserved human oocytes. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1999; 180: 1044 - 1045.
50. **Porcu E, Fabbri R, Petracci S et al.**: Ongoing pregnancy after ICSI of epididymal spermatozoa into human oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet* 1999; 16: 261 - 263.
51. **Porcu E, Fabbri R, Damiano G et al.**: Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol. Cell. Endocrinology* 2000; 169: 33 - 37.
52. **Rall WF, Reid DS and Polge C.**: Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. *Cryobiology* 1984; 21: 106 -121.
53. **Sathananthan AH, Ng SC, Trounson A et al.**: The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete. Res* 1988; 21: 385 - 401.
54. **Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L et al.**: The effects of cooling human oocytes. *Hum. Reprod* 1988; 8: 968 - 977.
55. **Schalkoff ME, Oskowitz, SP, Powers, RD et al.**: Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol. Reprod* 1989; 40: 379 - 393.
56. **Serafini P, Tran C and Tan T.**: Cryopreservation of human oocytes. A clinical trial. *J. Assist. Reprod. Genet* 1995; 12: 1S - 220S.
57. **Shaw JM.**: In : Trounson A, Gardner D. (Eds.), *Handbook of in vitro fertilization*. CRC Press. Boca Raton Florida 1993; p. 33431
58. **Stachecki J, Cohen J and Williansen S.**: Detrimental effects of sodium during mouse oocytes cryopreservation. *Biol. Reprod* 1998; 59: 395-400
59. **Tae K, Yoon MD, Hyung M et al.**: Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization - embryo transfer program. *Fertil. Steril* 2000; 74: 180 - 181.
60. **Todorow SJ, Siebzehrubl ER, Spitzer M et al.**: Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze - thawing regimens. II. Human. *Hum. Reprod* 1989; 4: 812 -816.
61. **Tucker M, Wright G, Morton P et al.**: Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1,2 propanediol and sucrose. *Hum. Reprod* 1996; 11: 1513 - 1515.
62. **Tucker M, Wright G, Morton P et al.**: Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil. Steril* 1998; 70:578-579.
63. **Van Blerkom J and Davis PW.**: Cytogenetic, callular and developmental consequences of cryopreservation of immature and human oocytes. *Microscopy. Res. Tec* 1994; 27: 165-193.
64. **Vidali A, Dani G, Antorini M et al.**: Oocyte cryopreservation is a viable alternative option for patients who refuse embryo freezing. *Fertil. Steril* 1998; 70 (Suppl.1), S138
65. **Vincent C and Johnson MH.**: Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxf. Rev. Reprod.Biol* 1992; 14:73-100
66. **Wu J, Zhang L and Wang X.**: In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 2001; 121:389-393
67. **Yang DS, Blohm PL, Cramer L et al.**: A successful human oocyte cryopreservation regime: survival, implantation and pregnancy rates are comparable to that of cryopreserved embryos generated from sibling oocytes. *Fertil. Steril* 1999; 72 (Suppl. 1), S86
68. **Yang DS, Blohm PL, Winlow L and Cramer L.**: A twin pregnancy after microinjection of human cryopreserved oocyte with a specially developed oocyte cryopreservation regime. *Fertil. Steril* 1998; S239, p - 357.
69. **Yoon TK, Chung HM, Lim JM et al.**: Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil. Steril* 2000; 74:180-181
70. **Young E, Kenny A, Puigdomenech E et al.**: Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved oocytes: case report. *Fertil. Steril* 1998; 70: 360 -361.