

## **EFFECTES DE LA CRIOPRESERVACIÓ EN OÒCITS I EMBRIONS DE DIFERENTS ESPÈCIES**

MERCÈ MARTÍ, JOSEP SANTALÓ I MONTSERRAT PONSÀ

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

### **RESUM**

El procés de congelació/descongelació de gàmetes i embrions, i també les manipulacions prèvies i posteriors, poden implicar alteracions en les cèl·lules sotmeses al procés.

Els estudis realitzats sobre els efectes de la congelació es realitzen a partir de la supervivència, de l'estudi cromosòmic, de l'estudi ultraestructural i de l'estudi del desenvolupament cel·lular posterior a la descongelació. Aquests estudis mostren que el grau d'alteracions que el procés pot implicar depèn de l'espècie amb què es treballa, del tipus cel·lular i del mètode de congelació que s'utilitza.

En aquest treball es recullen les dades publicades sobre el tema, i es dona una visió general de l'impacte que té la tècnica sobre els oòcits i els embrions de diferents espècies.

### **SUMMARY**

Gametes and cell-embryos submitted to freezing and thawing methods can be affected by the process.

Studies on effects produced by freezing procedures have been made focusing on surviving, cytogenetics, ultrastructure and cellular development after thawing. These studies show that the induced alterations depend on the species, the kind of cell and the freezing method used.

This work is a review about the results obtained after freezing and thawing oocytes and embryos from different mammalian species.

## INTRODUCCIÓ

La congelació i la descongelació comporten un gran estrès per als gàmetes i les cèl·lules de l'embrió, si tenim en compte els processos als quals es veuen sotmesos. Hi ha diferents factors que poden actuar sobre la cèl·lula en aquest procés, per la qual cosa analitzarem separatament cadascun d'ells.

Podem distingir dos aspectes diferents de la disminució de la temperatura: el simple refredament i la congelació. Les diferències entre ambdues sorgiran, probablement, no sols de les temperatures finals assolides sinó, també de totes les manipulacions addicionals que els protocols de congelació requereixen (addició de crioprotectors, xocs osmòtics, etc.). Així, per exemple, en el refredament s'observa una despolimerització dels microtúbuls, que en el procés de congelació queda compensat pels efectes del crioprotector.

El coneixement i la descripció de les alteracions que aquestes manipulacions poden ocasionar sobre els gàmetes i els embrions, ens permetrà conèixer quines són les estructures més sensibles al procés, i quin mètode és el més eficaç, i per tant, anar millorant l'eficiència de la tècnica.

Els estudis sobre els efectes dels diferents mètodes de congelació de gàmetes i embrions es fan a partir de la supervivència, analitzada segons la morfologia que presenten les cèl·lules, a l'estudi cromosòmic i a l'estudi ultraestructural; a la capacitat de fecundació en el cas d'òocits i espermatozoides, i al desenvolupament embrionari postdescongelació.

Seria molt valuós poder establir i unificar uns criteris en l'anàlisi de la morfologia cel·lular, a l'hora de valorar les anomalies aparegudes com a resultat del procés de congelació. S'ha de tenir en compte que les alteracions observades després de la descongelació poden

anar, des d'una lisi completa de tots els blastòmers (23), una alteració de només alguns blastòmers (si la meitat o més dels blastòmers estan intactes, l'embrió pot continuar el seu desenvolupament sense problemes (38), havent-se obtingut fins i tot un embaràs a partir d'un embrió en l'estadi de quatre cèl·lules el qual només presentava un blastòmer intacte després de la descongelació (42)), fins a alteracions menys evidents en el desenvolupament (23) o en la morfologia de la cèl·lula (24).

A més, just després de la descongelació i l'extracció del crioprotector, els blastòmers poden presentar un aspecte contret i deformat del que es recuperen en deixar-los en cultiu dotze hores (38). És per això que el control de la morfologia cel·lular s'ha de fer després d'un temps de recuperació.

D'altra banda, s'ha d'especificar en cada cas quin mètode de criopreservació és l'utilitzat, ja que les conseqüències poden ser molt diferents en utilitzar l'un o l'altre. També és indispensable tenir en compte l'espècie de què es tracta i el moment del desenvolupament en què es congela, perquè els components cel·lulars poden canviar, i determinar una major o menor resistència als diferents processos. Així, aquelles estructures que hom ja sap que són termosensibles o quimiosensibles mereixen una especial atenció (aquest pot ser el cas dels microtúbuls, per exemple) (18).

El moment del cicle cel·lular pot també influir en l'èxit de la criopreservació. Els embrions que es congelen quan tenen un nombre de blastòmers de 2, 4 o 8 cèl·lules estan menys afectats que aquells embrions congelats en estadis de divisió intermedis (3, 5 o 7 cèl·lules). És més probable que tots els blastòmers d'un embrió de 2, 4 o 8 cèl·lules estiguin en interfase que no en els embrions d'estadis intermedis. Aquest estat de descans

mitòtic podria estar relacionat amb una major estabilitat de la membrana plasmàtica, la qual pot determinar una major supervivència postcongelació (18).

És important, a l'hora d'avaluar els efectes del procés de congelació i descongelació sobre el desenvolupament embrionari, conèixer com poden afectar les manipulacions prèvies i posteriors a la congelació, ja sigui d'una manera directa o indirecta. Un factor que cal tenir en compte és el temps que porta l'embrió cultivat *in vitro* abans de ser congelat. S'ha indicat que el cultiu *in vitro* combinat amb la congelació pot tenir un efecte deleteri en els blastòcits de ratolí (20). Igualment s'ha descrit que els embrions humans que porten un dia en cultiu resisteixen millor el procés de congelació/descongelació que els que porten dos dies.

Tant en embrions humans (9, 11), de boví (29), conill (3) com ratolí (4), s'ha descrit que el cultiu *in vitro*, abans de la transferència a l'úter, té com a conseqüència un augment en el percentatge d'avortaments. Pels mateixos motius cal diferenciar si la fecundació s'ha realitzat *in vivo* o *in vitro*.

Finalment, en estudiar les anomalies causades per un mètode específic, hem de tenir en compte que tot i que una alteració de tipus morfològic pot ser reversible, aquesta pot haver ocasionat altres alteracions que no siguin recuperables (48). Aquest és el cas de la desorganització dels microfilaments en els oòcits, que tot i ser recuperable provoca un enduriment de la zona pel·lúcida (ZP), com a conseqüència de l'alliberament dels grànuls corticals; tornarem més endavant a aquesta qüestió.

Per tot això, hem intentat en aquesta revisió ordenar les dades bibliogràfiques de què disposem sobre el tema, tenint en compte l'espècie en què s'han realitzat els estudis, el

tipus cel·lular, i el factor dins del procés de la congelació en el qual se centra l'observació.

La congelació de gàmetes i embrions humans té importants aplicacions en les tècniques de reproducció assistida: bancs de semen, congelació dels oòcits i embrions sobrants en els cicles de fecundació *in vitro*. Aquells oòcits que no presenten una bona morfologia, i també aquells embrions que tenen més de la meitat dels blastòmers alterats, s'utilitzen per fer els estudis dels efectes de la congelació en les mostres procedents de l'espècie humana.

Tot i així, és sense dubte en el ratolí on es tenen més dades. La facilitat amb la qual es reproduïen i es mantenen a l'estabulari, junt amb el coneixement que es té de les tècniques d'obtenció i cultiu dels gàmetes en aquesta espècie, fan que sigui el model escollit en molts laboratoris.

Hi ha també estudis realitzats en altres espècies animals d'interès pecuari. En elles, la tècnica de congelació permet el transport i l'emmagatzematge de gàmetes i embrions, la qual cosa té importants implicacions en el camp de la producció animal.

En aquest recull ens hem centrat en oòcits i embrions. Atès que en les mostres de semen el nombre d'espermatozoides és molt nombrós, no s'han realitzat tants estudis per augmentar el percentatge de supervivència al procés de congelació. Per contra, el nombre d'oòcits i embrions de què es disposa sempre és limitat; per això cal optimitzar al màxim la tècnica, a fi de recuperar el màxim nombre possible de mostres.

Quant als factors que poden afectar la cèl·lula, s'han analitzat separadament els efectes del refredament, l'efecte de l'addició de crioprotectors i la congelació en conjunt. No disposem d'aquestes dades en totes les espècies,

i no sempre aquests estudis s'han fet separatament. En aquest cas, el nostre criteri ha estat diferenciar en quin dels factors se centra cada observació, tot i que d'altres factors també hi actuen.

## **EFFECTES DE LA CRIOPRESERVACIÓ EN OÒCITS I EMBRIONS**

### **Espècie humana**

#### *Efectes de refredament en oòcits*

El refredament dels oòcits per sota de 37 °C, provoca anomalies en l'organització del fus meiótic i, per consegüent, en la distribució dels cromosomes. Anomalies que es mantenen en un 70 % dels casos després de deixar-los recuperar durant 1-4 hores a 37 °C (27). Els oòcits humans semblen, en aquest aspecte, més sensibles i més difícils de recuperar que els oòcits de ratolí (15).

També s'han descrit petits canvis en la ultraestructura d'alguns oòcits refredats: elongació de les vesícules del reticle endoplasmàtic rugós i trencaments de la ZP (35).

#### *Efectes de la congelació en oòcits*

En els oòcits congelats s'observa una ultraestructura ben conservada en la majoria, independentment de la tècnica utilitzada. Els que no es consideren ben preservats presenten alguna de les anomalies següents :

- trencaments en la membrana cel·lular;
- desorganització de l'oooplasma (sobretot després de la vitrificació);

— agrupament dels cromosomes i desorganització del fus meiótic amb pèrdua de microtúbuls, la qual cosa podria ocasionar alteracions cromosòmiques (encara per confirmar) (33);

— petits trencaments en la ZP, que podrien no detectar-se amb microscòpia òptica (MO). La fecundació d'aquests oòcits podria incrementar la taxa de polispèrmia (32), ja que la reacció cortical i el bloqueig de la polispèrmia seria menys efectiu (31). Ara bé, aquest fenomen no s'ha observat pas en els embrions que han estat sotmesos a la tècnica de PZD (*partial zona dissection*) (6).

Utilitzant criomicroscopis, s'han descrit alteracions causades per factors mecànics com són la deformació de l'oòcit en les zones de contacte amb el front de gel en creixement, i la formació, durant la descongelació, de bombolles d'aire dins el citoplasma en aquelles zones de deformació (2). Atès que en disminuir la temperatura augmenta el grau de solubilitat dels gasos, en tornar-la a augmentar poden formar-se bombolles d'aire que van creixent, i que ocupen cada vegada més espai del citoplasma.

En els estudis ultraestructurals de la fecundació d'oòcits inseminats després de la congelació/descongelació, s'observen tots els estadis de la penetració de l'espermatozoide a través del cúmul i de la ZP, tal com es descriu en els oòcits de control (32). Si la congelació afecta l'ooolema, no es dona una fusió de membranes entre els gàmetes, sinó que s'observa una penetració de l'espermatozoide que no donarà lloc a un desenvolupament embrionari normal. Aquest fenomen també s'ha descrit en la penetració d'oòcits degenerats (32)

D'altra banda, en zigots en l'estadi de pronucli provinents d'oòcits fecundats després de la vitrificació, s'ha vist que tot i conservar la

ultraestructura, poden presentar polispermia (deguda segurament a l'alteració de la zona pel·lúcida), i nombrosos micronuclis en l'ooplasma. L'aparició de micronuclis podria ser deguda a una dispersió dels cromosomes, produïda per una alteració del fus meiótic o per una incompleta incorporació de la cromatina durant la formació del pronucli (35).

El desenvolupament embrionari d'aquells oòcits que superen el procés de la congelació/descongelació i són fecundats és normal, tot i que en alguns embrions provinents d'oòcits vitrificats s'han observat anomalies: fragments anucleats i cèl·lules multinucleades corbades en forma de mitja lluna envoltant les altres cèl·lules. Aquests embrions amb cèl·lules multinucleades podrien provenir de zigots polispermics amb la ZP alterada per la vitrificació (40).

### ***Efectes del crioprotector en embrions***

S'han realitzat diferents estudis per avaluar la toxicitat dels crioprotectors en els embrions. En el cas del glicerol, s'ha observat que pot ocasionar la fusió de les membranes plasmàtiques quan s'utilitza en estadis de desenvolupament embrionari primaris (39). Si es congelen mòruls en presència de glicerol, s'han descrit alteracions d'alguns orgànuls i altres components cel·lulars (24) i la formació de blastocists anormals amb múltiples blastocels (23).

Els embrions en els primers estadis de desenvolupament tenen blastòmers més grans que en els d'estadis de desenvolupament posteriors (i per tant, tenen una relació superfície/volum menor, la qual cosa dificulta l'entrada del crioprotector del medi en la cèl·lula), i triguen molt a equilibrar-se, atesa la baixa permeabilitat al glicerol (22). Aquest fet

pot provocar un baix percentatge de glicerol intracel·lular, que pot ser molt perjudicial. D'altra banda, és difícil de treure després de la descongelació, i s'observa una excessiva hidratació dels blastòmers que els causa un inflament (38).

El sulfòxid de dimetil (DMSO) és un dels crioprotectors més utilitzats en la congelació d'embrions humans. Utilitzant aquest crioprotector s'obté un alt nombre d'embrions amb més del 50 % dels blastòmers morfològicament normals (38). Aquest és el criteri que normalment s'utilitza per decidir si un embrió pot ser transferit o no.

Els estudis per determinar la toxicitat del propilenglicol (PROH) a temperatura ambient, donen resultats negatius, ja que els embrions no presenten alteracions al microscopi òptic (MO) i es desenvolupen *in vitro* d'una manera equivalent als embrions de control. De tota manera, s'observa un ràpid encongiment seguit d'un inflament dels blastòmers durant els tres primers minuts d'exposició al crioprotector (18), a causa de problemes de permeabilitat i d'estrès osmòtic.

### ***Efectes de la congelació en embrions***

Pel que fa als mètodes de congelació, embrions congelats lentament fins a  $-80^{\circ}\text{C}$  amb DMSO, que presenten la meitat dels blastòmers bé i l'altra meitat alterada, s'han estudiat a microscòpia electrònica (ME). En els blastòmers considerats com a no alterats segons les observacions al MO, s'han observat petites modificacions, com diferents formes de desorganització del fons del citoplasma. Això podria ser degut a la formació de cristalls (36) o a la desorganització de la xarxa microtubular o de microfilaments. Aquelles cèl·lules que no sobreviuen presenten la membrana plasmàtica trencada i una alta desorganització (35).

Un criteri per valorar si la ZP està alterada és l'observació amb el MO de línies de fractura en la seva superfície (28). En aquest sentit, no s'han observat alteracions en la ZP després de descongelar embrions criopreservats amb PROH seguint un mètode de congelació lenta fins a  $-30^{\circ}\text{C}$ . (18).

## Ratolí

### *Efectes del refredament en oòcits*

El refredament dels oòcits ocasiona alteracions en el fus mitòtic, que augmenten com més baixa és la temperatura, i que costen més de recuperar quan el temps d'exposició s'allarga. A  $37^{\circ}\text{C}$  només un 12 % dels oòcits mostren alteracions en la forma del fus, a  $20^{\circ}\text{C}$  augmenta fins al 89 %, i a  $4^{\circ}\text{C}$  el 75 % dels oòcits mostren un fus alterat, mentre que en el 25 % restant no es pot identificar.

Quan la temperatura d'exposició ha estat de  $20^{\circ}\text{C}$  durant 30 minuts, en tornar-los a  $37^{\circ}\text{C}$  s'aconsegueix recuperar una morfologia del fus normal en un 77 % dels oòcits, mentre que si l'exposició ha estat de 60 minuts, només es recuperen un 54 % dels oòcits (41).

Les anomalies trobades en aquests oòcits refredats són un allargament en l'eix longitudinal del fus amb reducció del diàmetre. En alguns casos conserven en la part equatorial el diàmetre inicial. També s'han trobat microtúbuls fora de l'àrea del fus (41). El desacoblament dels microtúbuls provoca la desorganització del fus, amb la consegüent dispersió dels cromosomes i del material pericentriolar.

La fecundació d'aquests oòcits amb el fus desorganitzat podria donar lloc a aneuploïdies (15). En la congelació, l'efecte oposat del

crioprotector (facilita la polimerització de la tubulina lliure, i estabilitza així el fus) evitaria aquesta desorganització i, per tant, l'aparició d'aneuploïdies. Ara bé, les dades aportades sobre aquesta qüestió es contradiuen (12, 17), i queda per tant, sense resoldre aquest aspecte (vegeu els efectes de la congelació en embrions de ratolí).

### *Efectes dels crioprotectors en oòcits*

Pel que fa a l'efecte del DMSO a  $37^{\circ}\text{C}$ , en resulta una massiva proliferació de microtúbuls en el citocòrtex de la cèl·lula, i forma una xarxa que engloba el fus mitòtic que provoca la seva desorganització i la dispersió dels cromosomes (13). Quan el DMSO és eliminat torna a recuperar-se una organització normal, però un 10 %-40 % d'oòcits queden alterats. Sembla que el DMSO segresta part de l'aigua coligativa, i augmenta així la concentració de tubulina lliure, fenomen que es compensa amb la polimerització d'aquesta en microtúbuls. Quan s'afegeix el crioprotector a  $4^{\circ}\text{C}$  l'efecte disminueix, atès que el refredament evita una elevada polimerització.

Un altre efecte del DMSO observat a  $37^{\circ}\text{C}$  és l'alteració de la xarxa de microfilaments subcortical, particularment en la regió sobre la placa metafàsica, on arriba a desaparèixer en alguns oòcits (44). Aquest efecte sembla desaparèixer en eliminar el crioprotector, i es pot evitar en incorporar el DMSO a  $4^{\circ}\text{C}$  (15). Per això podem pensar que, també en aquest cas, el refredament té algun efecte sobre els microfilaments.

Tot i que l'alteració causada sobre els microfilaments es pugui recuperar en eliminar el DMSO, poden haver-hi conseqüències perdurables, com és l'enduriment de la zona

pel·lúcida, que provoca una resistència a la penetració dels espermatozoides. Com ja s'ha dit abans, aquest enduriment podria provenir en part de l'alteració de la xarxa de microfilaments, la qual provocaria l'alliberament d'alguns grànuls corticals i produir-se així, una reacció cortical prematura. Aquests canvis en la ZP no s'han observat quan el DMSO s'afegeix a 4 °C (13, 14). L'alteració de la zona pel·lúcida pot implicar no només alteracions en la fecundació, sinó també en el moment de l'eclosió, i pertant, de la implantació de l'embrió (10, 8).

S'han realitzat estudis en els quals es compara l'acció del PROH amb la del DMSO. S'observa que ambdós estableixen el fus mitòtic, ja que tant amb un crioprotector com amb l'altre disminueix el nombre d'oòcits amb el fus alterat en refredar fins a 20 °C. A més, ambdós crioprotectors provoquen la formació d'àsters microtubulars, la qual cosa també es pot associar amb la capacitat dels crioprotectors d'afavorir la polimerització de la tubulina, en fer augmentar la seva concentració en forma lliure dins el citoplasma. En eliminar un crioprotector o l'altre, els àsters desapareixen.

La diferència entre els dos crioprotectors es troba en la reversibilitat dels seus efectes sobre el fus mitòtic. Quan s'elimina el DMSO i es tornen els oòcits a 37 °C, aquests recuperen la morfologia normal del fus en un percentatge similar al que ho fan els refredats sense crioprotector. En canvi, en eliminar el PROH i tornar els oòcits a 37 °C, un 83 % d'aquests perden el fus mitòtic quan el refredament ha estat de 30 min, i augmenta aquesta xifra a un 95 % quan el refredament ha durat 60 min. Aquest fenomen està clarament associat al moment de l'eliminació del PROH o al retorn a 37 °C, perquè, com ja s'ha esmentat, a 20 °C el crioprotector estableix el fus.

El refredament dels oòcits amb DMSO no altera el percentatge de fecundació ni augmenta les anomalies cromosòmiques (12). La supervivència dels oòcits refredats amb PROH és menor, però els que sobreviuen presenten un percentatge de fecundació i desenvolupament embrionari sense diferències significatives en comparar-los amb els oòcits de control.

Atès que un nombre molt elevat d'aquests oòcits refredats amb PROH mostraven absència de fus acromàtic, el fet que siguin fecundats i es desenvolupin en un percentatge semblant al control fa suposar que els oòcits tornen a organitzar el fus acromàtic durant les 4 h d'inseminació (41). Aquests fenomen ja s'ha descrit en altres estudis, on es demostra la reorganització del fus (26) i una fecundació normal (12) en oòcits refredats fins a 0 °C.

Atès que un senyal de l'activació o la fecundació de l'oòcit és una descondensació dels cromosomes (provocada per un augment intracel·lular de  $Ca^{2+}$ ), la despolimerització del fus va fer pensar que el PROH podria tenir propietats d'activador partenogenètic dels oòcits de ratolí (41). L'activació partenogenètica causada pel PROH va ser demostrada per Shaw i Trounson (37). La possibilitat de donar com a fecundats oòcits partenogenètics podria dificultar molt l'aplicació de la tècnica i disminuir-ne l'interès. Els oòcits activats partenogenèticament poden ser difícils de diferenciar dels oòcits fecundats, poden implantar-se i ocasionalment arribar *in vivo* a l'estadi de desenvolupament embrionari on es formen els primordis de les extremitats (16).

A més dels microtúbuls, s'han trobat altres estructures cel·lulars sensibles al procés de la congelació. Recentment s'han realitzat estudis sobre l'efecte del PROH en els microfilaments d'actina (45). En ells es mostra que el crioprotector provoca canvis en l'associació de

les molècules d' $\alpha$ -actina, i donen com a resultat microfilaments febles i inestables.

### ***Efectes de la congelació en oòcits***

Hi ha divergències a l'hora de determinar si la congelació ocasiona alteracions cromosòmiques en els oòcits. Segons Glenister i col·l. (12), la congelació amb DMSO realitzada d'una manera lenta (fins  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  /  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), no provoca augments en l'índex d'aneuploidies, però sí un significatiu augment de les poliploidies, que inclouen el doblament d'ambdós complements cromosòmics. Aquestes dades es contradiuen amb les aportades per Kola i col·l. (17), segons les quals la incidència d'aneuploidies és unes tres vegades més gran que en els control, tant si el mètode emprat és el de congelació lenta com el de vitrificació.

D'altra banda, s'han descrit alteracions degudes a factors mecànics. El contacte amb el front de gel provoca una deformació en l'oòcit, que podria estar relacionada amb la formació en aquesta zona de punts febles, a través dels quals, durant el procés de descongelació, es podria filtrar el citoplasma alterat. Utilitzant un criomicroscopi, s'ha pogut observar la formació de bombolles d'aire intracel·lulars i extracel·lulars durant el procés de la congelació (2).

### ***Efectes dels crioprotectors en embrions***

Les proves de toxicitat del PROH realitzades en embrions de ratolí mostren que una exposició durant 2-7 min amb PROH per sobre de 2,5 M inhibeix el desenvolupament embrionari en l'estadi de blastocist, perquè afecta la membrana plasmàtica i el pH cel·lular (7). En canvi, en els embrions de dues cèl·lules, el PROH comença a ser tòxic a partir de concentracions de 3,0 M (34).

Aquesta diferència podria estar relacionada amb el fet que, a partir d'un cert estadi de desenvolupament, l'embrió passa a dependre de factors externs per activar la seva síntesi proteica. En els estadis de mòrula i blastocist, són els factors de creixement els implicats en l'activació de la síntesi proteica (49). Atès que actuen a través de receptors de superfície, és possible que el PROH a concentracions de 2,5 M alteri aquests receptors, i impedeixi així l'activació de la síntesi de proteïnes específiques necessàries per a seguir el desenvolupament embrionari normal.

Per contra, en els primers estadis de divisió (fins a l'estadi de dues cèl·lules tardà) la síntesi de proteïnes està regulada per factors citoplasmàtics de l'oòcit fecundat (5, 25), per la qual cosa, en ser utilitzat el PROH a una concentració per sobre de 2,5 M en aquests estadis, no es perjudica el posterior desenvolupament embrionari (7).

### ***Efectes de la congelació en embrions***

En embrions de ratolí congelats en l'estadi de vuit cèl·lules amb DMSO, mitjançant un mètode lent fins a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , s'ha observat que si es transfereixen els embrions directament després de la descongelació, el nombre de naixements és molt baix, mentre que si abans de la transferència es deixen recuperar *in vitro* 24-48 h, el percentatge de naixements és equiparable al control.

La ultraestructura d'aquests embrions no evidencia cap canvi en la membrana ni en els orgànuls que pugui explicar aquest fenomen, per la qual cosa es podria pensar en una recuperació metabòlica. Quant als microtúbuls del cos mitjà, del citoplasma i del fus acromàtic observats en alguns blastòmers d'aquests embrions immediatament després de la



congelació/descongelació, no s'observen despolimeritzacions (46).

També en els embrions de ratolí s'han descrit bombolles de gas com a conseqüència de la congelació/descongelació. En embrions de ratolí en l'estadi de dues cèl·lules seguint un procés de descongelació ràpida, s'ha observat, mitjançant un criomicroscopi, que una d'aquestes bombolles present en un dels blastòmers arriba a destruir tot l'embrió i a trencar la zona pel·lúcida (2).

Els estudis fets amb microscòpia electrònica de rastreig d'embrions congelats i descongelats en l'estadi de dues cèl·lules amb zona pel·lúcida, en que s'han realitzat les observacions després de la descongelació i en posteriors estadis de desenvolupament, mostren que les característiques de la superfície de la membrana plasmàtica, la distribució, la forma i la mida dels microvil·li, i també les regions de contacte entre blastòmers i les unions intercel·lulars creades després de la compactació, són equivalents a les característiques observades en els embrions de control (19).

## En altres espècies animals

Els embrions d'espècies com el porc, el cavall, la vaca i, amb menys extensió, l'ovella i la cabra, semblen tenir molta quantitat de material sensible a la temperatura en els estadis primerencs (21). En l'ovella, s'aconsegueix un bon percentatge de supervivència quan el procés de criopreservació es realitza a partir de l'estadi devuit cèl·lules, mentre que en la vaca no s'aconsegueixen bons resultats en estadis anteriors a la mòrula (48).

Sembla que el fet que els embrions siguin més o menys sensibles al refredament i a la congelació està associat a la presència de

vesícules que contenen material lipídic (21). Així, els embrions de porc i els embrions de vaca en els primers estadis de desenvolupament, presenten aquestes vesícules i són força sensibles al refredament (21), mentre que els embrions humans i els blastocists de vaca, que no presenten aquestes vesícules, són més resistents al refredament. En definitiva, les lipoproteïnes intercel·lulars semblen ser un dels components vesiculars més inestables en els embrions sensibles a la congelació.

## En boví

Els embrions de vaca primerencs refredats fins a 4 °C presenten diverses alteracions (21): deformació dels blastòmers, desigual distribució dels orgànuls citoplasmàtics, i vesícules globulars de tipus lipídic, deformades i en alguns casos fusionades.

En els embrions de vaca en l'estadi de blastocist les cèl·lules del trofocoderm són molt sensibles, mentre que les cèl·lules de la massa cel·lular interna es preserven bé (21).

## En conill

Els estudis realitzats amb oòcits de conill mostren que el fus microtubular és menys sensible a la temperatura que en el cas del ratolí. L'exposició durant 30 min a 20 °C no altera, en el cas d'oòcits de conill, l'organització dels microtúbuls.

Quan a 20 °C s'afegeix DMSO o PROH, l'organització microtubular esdevé alterada (44), i s'observa el fus mitòtic poc definit i els cromosomes desorganitzats. En presència de DMSO es veuen àsters en el citoplasma, i amb el PROH s'observen xarxes de microtúbuls.

En eliminar els crioprotectors, en ambdós casos els efectes desapareixen en la majoria d'òcits.

A 20 °C, el PROH actua com a despolimeritzador d'actina, mentre que no es pot demostrar el mateix per al DMSO (10). Aquest efecte del PROH també s'ha descrit en embrions de conill (43).

Dels òcits de conill congelats amb PROH, el 39 % són fecundats (en front del 81 % en els òcits de control), i d'aquests, un 9 % es desenvolupen fins a fetus normals, mentre que la proporció per als òcits de control és d'un 32 %. (44).

Igual que en els embrions de ratolí provinents d'òcits congelats, també en els embrions de conill s'observa un augment de poliploidies (1).

En estudis fets amb embrions de conill utilitzant com a crioprotector el PROH, s'ha determinat que quasi tots (89 %) els embrions congelats amb dues cèl·lules presenten una morfologia normal després del procés i es desenvolupen *in vitro* en un percentatge equivalent al dels embrions de control. En canvi, quan s'utilitza el DMSO, també són molts els embrions que presenten morfologia normal després de la descongelació, però molt pocs (5 %) continuen dividint-se *in vitro*. Sembla que el DMSO dóna poca protecció a l'embrió, en el qual apareixen quantitats letals de cristalls de gel, i que la toxicitat apareix amb més rapidesa que utilitzant PROH (30).

### En porc

No s'ha aconseguit recuperar embrions vius després del procés de congelació/descongelació, independentment de la velocitat de refredament i del medi utilitzat. Si el descens de la temperatura és per sota dels 10 °C, els embrions moren (48).

Aquest fet podria ser degut a una alteració en la membrana plasmàtica, ja que mentre que a 20 °C els embrions es tenyeixen amb la tinció

vital roig neutre, just després de treure'ls del gel han perdut aquesta propietat. En canvi, els embrions de control que es deixen a temperatura ambient segueixen mantenint la tinció durant un llarg període.

Sembla que els lípids de la membrana cel·lular canvien de fase quan la temperatura s'altera. Tot i ser recuperable, aquest canvi podria ocasionar alteracions irreversibles, com per exemple la interacció entre diferents proteïnes que normalment no es troben unides (48).

En resum, és clar que el grau de recuperació (entès com el percentatge d'òcits o embrions que sobreviuen al procés de congelació/descongelació) i el grau de supervivència (entès com el percentatge d'òcits fecundats i embrions que tenen un desenvolupament embrionari normal, posterior a la descongelació) depenen de l'espècie, del tipus cel·lular i del mètode de congelació que s'utilitza. Les dades obtingudes en aquests estudis mostren que cal assajar, per a cada cas, diferents mètodes per tal de trobar la tècnica més eficient.

## BIBLIOGRAFIA

1. AL-HASANI, S. K., K. DIEDRICH, H. VANDER VEN i D. KREBS (1986). Successful in-vitro fertilization of frozen-thawed rabbit oocytes. **Hum. Reprod.** 1: 309-312.
2. ASWOOD-SMITH, M. J., G. W. MORRIS, R. FOWLER, T. C. APPLETON i R. ASHORN (1988). Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. **Hum. Reprod.** 3: 795-802.
3. BINKER, P. E. i J. B. ANDERSON (1979). Transfer of cultured rabbit embryos. **Gamete Res.** 2: 65.
4. BOWMANN, P. i A. MCLAREN (1970). Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. **Embryol. Exp. Morphol.** 24: 203.
5. CAVANAGH, A. C., H. MORTON, B. F. ROLFE i A. A. GIDLEY-BAIRD (1982). Ovum factor: a first signal of pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.** 2: 97-101.
6. COHEN J., H. MALTER, G. WEIGHT, H. KORT, J. MASSEY i D. MITCHELL (1989). Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. **Hum. Reprod.** 4: 435-442.

7. DAMIEN, M., A. A. LUCIANO i J. J. PELUSO (1990). Propanediol alters intracellular pH and developmental potential of mouse zygotes independently of volume change. **Hum. Reprod.** 5: 212-216.
8. DEROM, M., A. A. LUCIANO i J. J. PELUSO (1987). Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction. **Lancet.** 1: 1236-1238.
9. EDWARDS, R. G., B. FISHEL, J. COHEN, C. B. FEHILLY, J. M. PURDY, J. M. SLATER, P. C. STEPTOE i J. M. WEBSTER (1984). Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. **J. In Vitro Fertil. Embryo Trans.** 1: 3.
10. EDWARDS, R. G., L. METTLER i D. E. WALTERS (1986). Identical twins and in vitro fertilization. **J. In Vitro Fertil. Embryo Trans.** 3: 114-117.
11. FEICHTINGER, W. i P. KEMETER (1984). In vitro fertilization as an out-patient/office procedure. Presented at the III World Congress of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, Helsinki, Finland, May 14 to 17, p: 116.
12. GLENISTER, P. H., M. J. WOOD, C. KIRBY i D. G. WHITTINGHAM (1987). The incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. **Gamete Res.** 16: 205-216.
13. JOHNSON, M. H. i S. J. PICKERING (1987). The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. **Dev.** 100: 313-324.
14. JOHNSON, M. H. (1989). The effect on fertilization of exposure of mouse oocyte to dimethylsulphoxide. **J. In Vitro Fertil. Embryo Trans.** 6: 168-175.
15. JOHNSON, M. H., C. VINCENT, P. R. BRAUDE i S. J. PICKERING (1990). The cytoskeleton of the oocyte: Its role in the generation of normal and aberrant pre-embryos. **Establishing a Successful Human Pregnancy. Sero Symposia.** Publications from Raven Press V. 66: 133-142.
16. KAUFMAN, M. H., S. C. BARTON i M. A. H. SURANI (1977). Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. **Nature.** 265: 53-54.
17. KOLA, I., C. KIRBY, J. SHAW, A. DAVEY i A. TROUNSON (1988). Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. **Teratology.** 38: 467-474.
18. LASSALLE, B., J. TESTAR i J. P. RENARD (1985). Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. **Fertil. Steril.** 44: 645-651.
19. MARTÍ, M., M. GROSSMANN, C. NOGUÉS i M. PONSÀ (1991). Observacions al microscopio electrònic de barrido de la membrana plasmàtica en embrions criopreservats. Coloquio Franco-iberico de Microscopia Electrònica. Barcelona
20. MASSIP, A., P. VANDER ZWALMEN, F. PUISSANT, M. CAMUS i F. FERROY (1984). Effect of in vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. **J. Reprod. Fertil.** 71: 199-204.
21. MOHR, L. R. i A. O. TROUNSON (1981). Structural changes associated with freezing of bovine embryos. **Biol. Reprod.** 25: 1009-1025.
22. MOHR, L. R. (1983). The assessment of mammalian preimplantation embryo viability. PhD dissertation. Monash Univ. Austràlia.
23. MOHR, L. R., A. O. TROUNSON, J. F. LEETON i C. WOOD (1983). Evaluation of normal and abnormal human embryo development during procedures in vitro. **Fertilization of the Human Egg In Vitro.** H.M. Beier, H. R. Lindner (eds), Berlin: Springer Verlag. pp: 211-221.
24. MOHR, L. R., A. TROUNSON i L. FREEMANN (1985). Deep-freezing and transfer of human embryos. **J. In Vitro Fertil. Embryo Trans.** 2: 1-10.
25. OROZCO, C., T. PERKINS i F. M. CLARKE (1986). Platelet-activating factor induces the expression of early pregnancy factor activity in female mice. **J. Reprod. Fertil.** 78: 549-555.
26. PICKERING, S. J. i M. H. JOHNSON (1987). The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. **Hum. Reprod.** 2: 207-216.
27. PICKERING, S. J., P. R. BRAUDE, M. H. JOHNSON, A. CANT i J. CURRIE (1989). Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. **Fertil. Steril.** 54: 102-108.
28. RALL, W. E. i C. POLDGE (1984). Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. **J. Reprod. Fertil.** 70: 285-292.
29. RENARD, J. P., Y. HEYMAN i J. P. OZIL (1980). Importance of gestation losses after non-surgical transfer of cultured and non-cultured bovine blastocysts. **Vet. Rec.** 107: 152.
30. RENARD, J. P. (1985). The cryopreservation of mammalian embryos. In: **Human In Vitro Fertilization: Actual Problems and Prospects.** J. Testar, R. Frydman (eds). Amsterdam, Elsevier Publishers, pp: 201-208.
31. SATHANANTHAN, A. H. (1984). Ultrastructural morphology of fertilization and early cleavage in the human. In: **In Vitro Fertilization and Embryo Transfer.** A. Trounson, C. Wood (eds.), London: Churchill Livingstone, pp. 131-158.
32. SATHANANTHAN, A. H. S. C. NG, R. EDIRISINGHE i S. S. RATNAM (1986). Sperm-oocyte interaction in the human during polyspermic fertilisation in vitro. **Gamete Res.** 15: 317-326.
33. SATHANANTHAN, A. H., A. O. TROUNSON i L. FREEMANN (1987). Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. **Gamete Res.** 16: 343-354.
34. SATHANANTHAN, A. H., A. O. TROUNSON, L. FREEMANN i T. BRADY (1988). The effects of cooling human oocytes. **Hum. Reprod.** 3: 968-977.
35. SATHANANTHAN, A. i A. O. TROUNSON (1989). Effects of culture and cryopreservation on human oocyte and embryo ultrastructure and function. In: **Ultrastructure of Human Gametogenesis and Early Embryogenesis.** J. Van Blerkom and P.M. Motta eds. Kluwer Academic Publishers. Càp. 6: 182-199.

36. SCHNEIDER, U. (1986). Cryobiological principles of embryo freezing. **J. Vitro Fertil. Embryo Trans.** 3: 3-9.
37. SHAW, J. M. i A. O. TROUNSON. Parthenogenetic activation of unfertilized mouse oocytes by exposure to 1,2 propanediol is influenced by temperature, oocyte age and cumulus removal. **Gamete Res.** 24: 269-279.
38. TROUNSON, A. O. i L. R. MOHR (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. **Nature.** 305: 707-709.
39. TROUNSON, A. (1984). In vitro fertilization and embryo preservation. In: **In Vitro Fertilization and Embryo Transfer**. A. Trounson C. wood (eds), Edinburgh: Churchill Livingstone, pp: 111-130.
40. VAN BLERKOM, J., G. P. HENRY I R. P. PORRECO (1984). Preimplantation human embryonic development from polynuclear eggs after in vitro fertilization. **Fertil. Steril.** 41: 686-696.
41. VANDERELST, J., E. VANDERABBEEL, R. JACOBS, E. WISSE i A. VAN STEIRTEGHEM (1988). Effect of 1,2 propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. **Hum. Reprod.** 3: 960-967.
42. VEIGA, A., G. CALDERÓN, P. N. BARRI I B. COROLEU (1987). Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with <50% intact blastomeres. **Hum. Reprod.** 4: 321-323.
43. VINCENT, C., G. PRUELIERE, E. PAJOT-AUGY, V. GARNIER, E. CAMPION, E. NGUYEN i J. P. RENARD (1988). Comparative effect of cryoprotectants on rabbit embryos cytoskeleton. **Cryo-letters.** 8: 356-361.
44. VINCENT, C., V. GARNIER, Y. HEYMAN i J. P. RENARD (1989). Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. **J. Reprod. Fert.** 87: 809-820.
45. VINCENT, C., G. PRUELIERE, E. PAJOT-AUGY, E. CAMPION, E. GARNIER i J. P. RENARD (1990). Effects of cryoprotectants on actin filaments during cryopreservation of one-cell rabbit embryos. **Cryobiology.** 27: 9-23.
46. WHITTINGHAM, D. G. i E. ANDERSON (1976). Ultrastructural studies of frozen-thawed 8-cell mouse embryos. **J. Reprod. Fertil.** 48: 137-140.
47. WILMUT, I. (1972). The low temperature preservation of mammalian embryos. **J. Reprod. Fertil.** 31: 513-514.
48. WILMUT, I. (1986). Cryopreservation of Mammalian Eggs and Embryos. In **Developmental Biology**. A Comprehensive synthesis. Vol.4 Manipulation of Mammalian Development. RBL Gwatkin ed. Plenum Press. Cap.7: 217-247.
49. WOOD, S. A. i P. L. KAYE. Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. **J. Reprod. Fertil.** 85: 575-582.