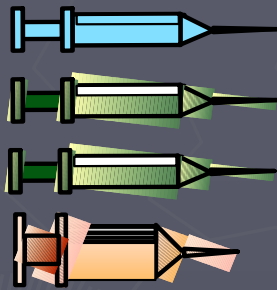


A microscopic view of sperm cells. The heads are stained a deep purple color, and the tails are long, thin, and clear. The cells are scattered across the field of view. The background is a light, slightly textured surface.

TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

ESTIMULACIÓN OVÁRICA



Gn-RH

FSH

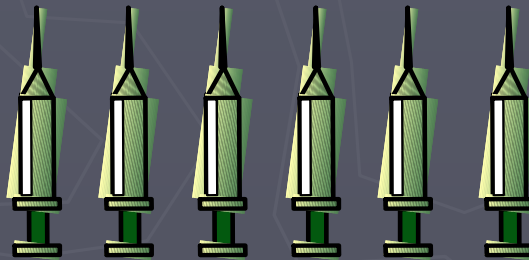
hMG

hCG (10000 UI)



Progesterona vaginal
200mg/12h

MENSTRUACION



Gn-RH

Día

3

4

5

6

7

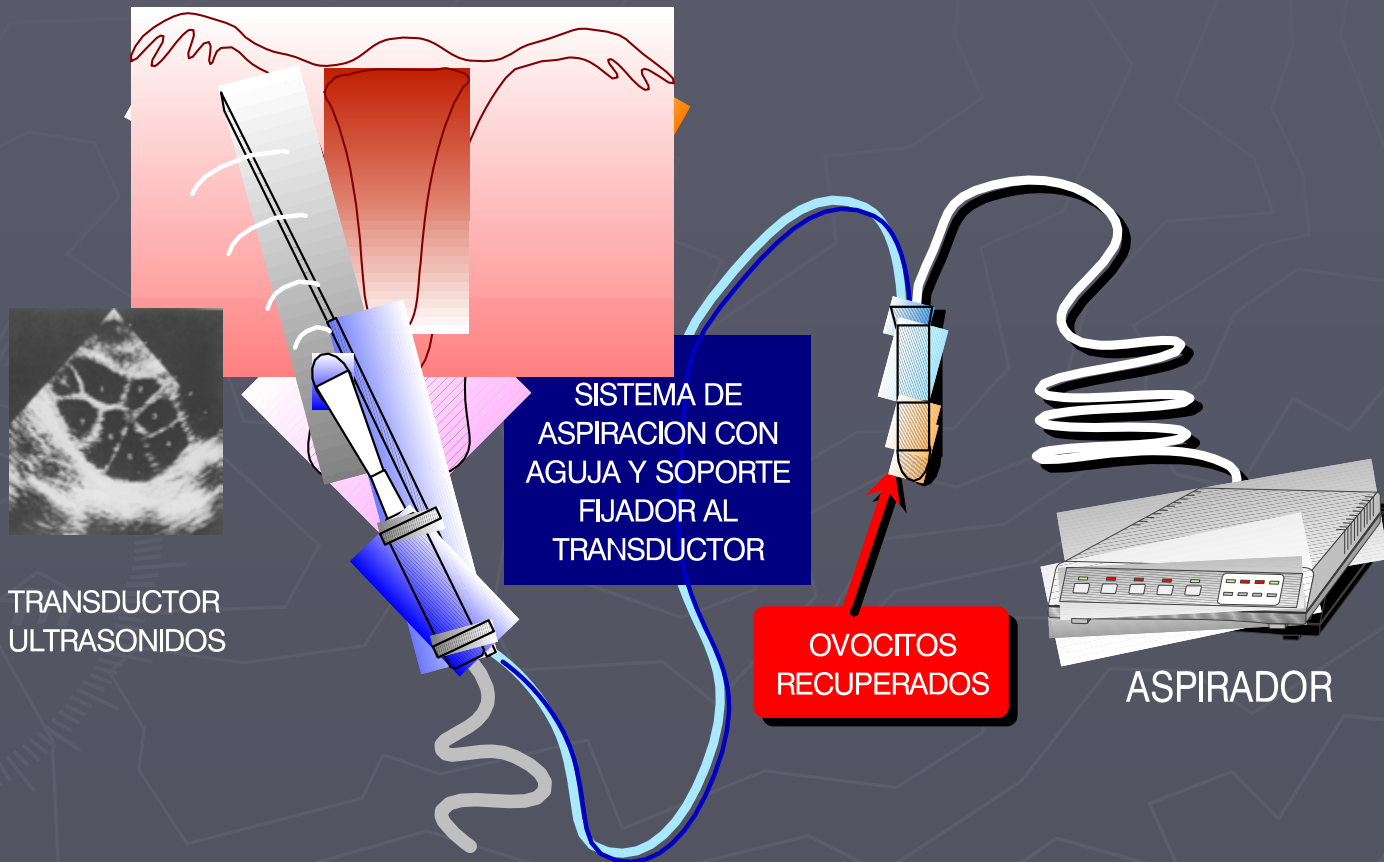
8

Día 0

*Puncion 36h
post-hCG*

TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

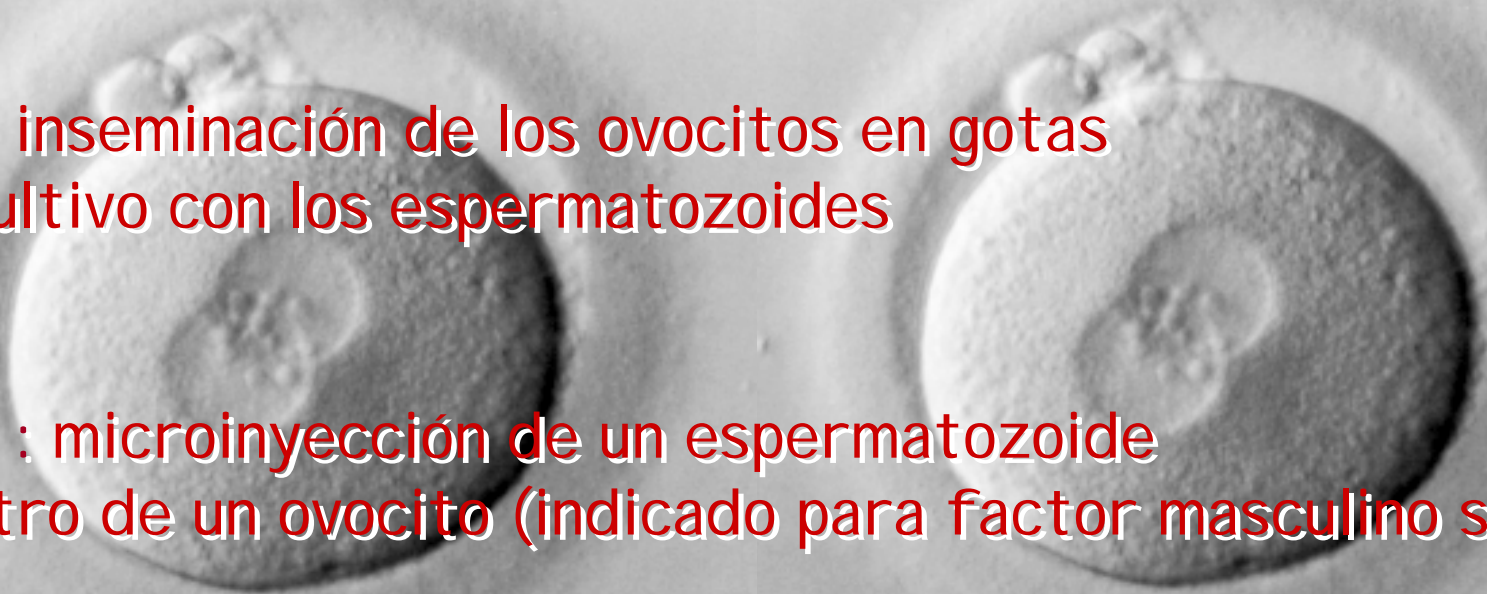
PUNCION FOLICULAR TRANSVAGINAL



TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

FIV: inseminación de los ovocitos en gotas de cultivo con los espermatozoides

ICSI: microinyección de un espermatozoide dentro de un ovocito (indicado para factor masculino severo)



TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

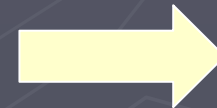
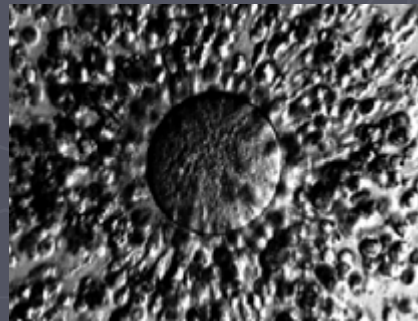


FIV

- ▶ Dilución de espermatozoides (200.000/ ml).
- ▶ Contacto de óvulos y espermatozoides en microgota.

TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

- ▶ Decumulación de los ovocitos
- ▶ Hialuronidasa: 80UI /ml
- ▶ Batería de pipetas de diferentes diámetros



TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

ICSI



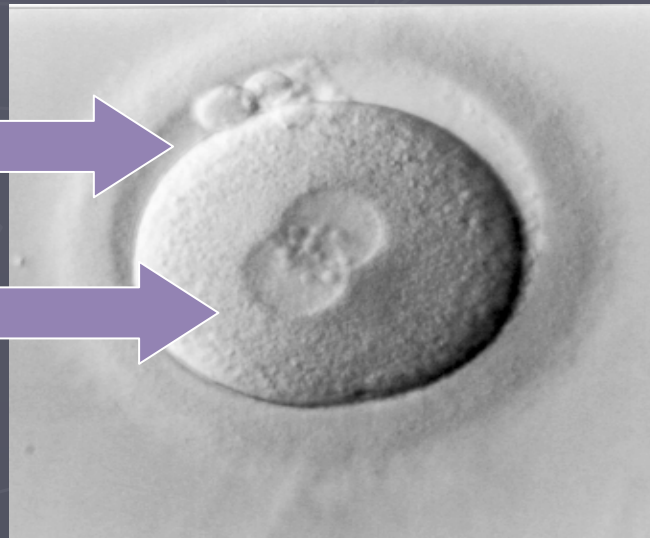
TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

FECUNDACIÓN

17-21H post-inseminación

2 CP

2 PN



TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA



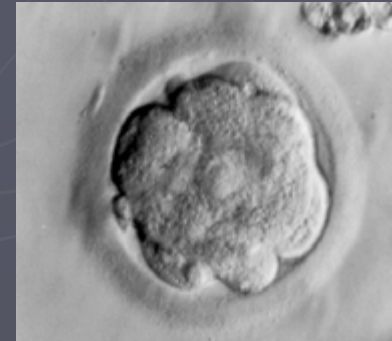
fecundación



Dia 2



Dia 3



Dia 4



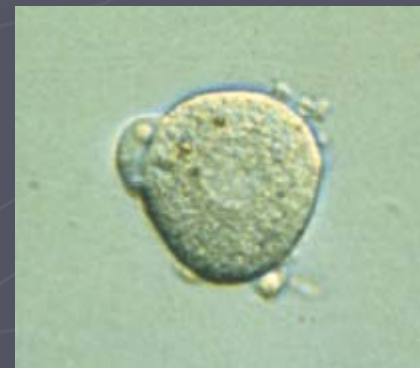
Dia 5



Dia 6

TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

DPI



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

- CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES
- CONGELACIÓN DE OVOCITOS
- CONGELACIÓN DE EMBRIONES
- CONGELACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

Principios básicos de criobiología

- Criopreservación de material biológico: procesos físico-químicos
- Cristales de hielo puro (- 5 y - 10 °C)
 - Intracelulares (no)
 - Extracelulares
- Medio extracelular: solutos + concentrados ↑ deshidratación celular para mantener equilibrio osmótico
- Velocidad de congelación: influencia **IMPORTANTE**
 - Si es muy rápida: hielo intracelular
 - Si es muy lenta: colapso celular
 - Estudiar la velocidad de enfriamiento adecuada
- Factores físicos. Influencia
 - Estrés osmótico
 - Fuerza física del frente de hielo
- Papel de los crioprotectores

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

CRIOPROTECTORES

De acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana celular:

❖ Agentes penetrantes

- Bajo Pm y permeables a través de la membrana
- Desplazan paulatinamente el agua intracelular, evitando formación de cristales de hielo
- Congelaciones a velocidad lenta
- Los más utilizados son:
 - 1,2-propanodiol ,DMSO ,EG ,Glicerol

❖ Agentes no penetrantes

- Alto Pm, no entran en la célula
- Promueven la rápida deshidratación celular
- Congelaciones a velocidades altas
- Los más utilizados son:
 - Azúcares: (sacarosa, glucosa, dextrosa) Lipoproteínas de la yema de huevo, Proteínas de alto PM

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

INDICACIONES:

- Donantes de semen: evita transmisión de enfermedades(HIV,Hep B y C)
- Pacientes de TRA con disponibilidad limitada (viajes, residentes en el extranjero (viajes, residentes en el extranjero)
- **Posibilidad de paternidad tras quimioterapia o radioterapia.**
- Pacientes de TRA con dificultad para recoger la muestra.
- Pacientes de TRA sometidos a BT o AE.

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

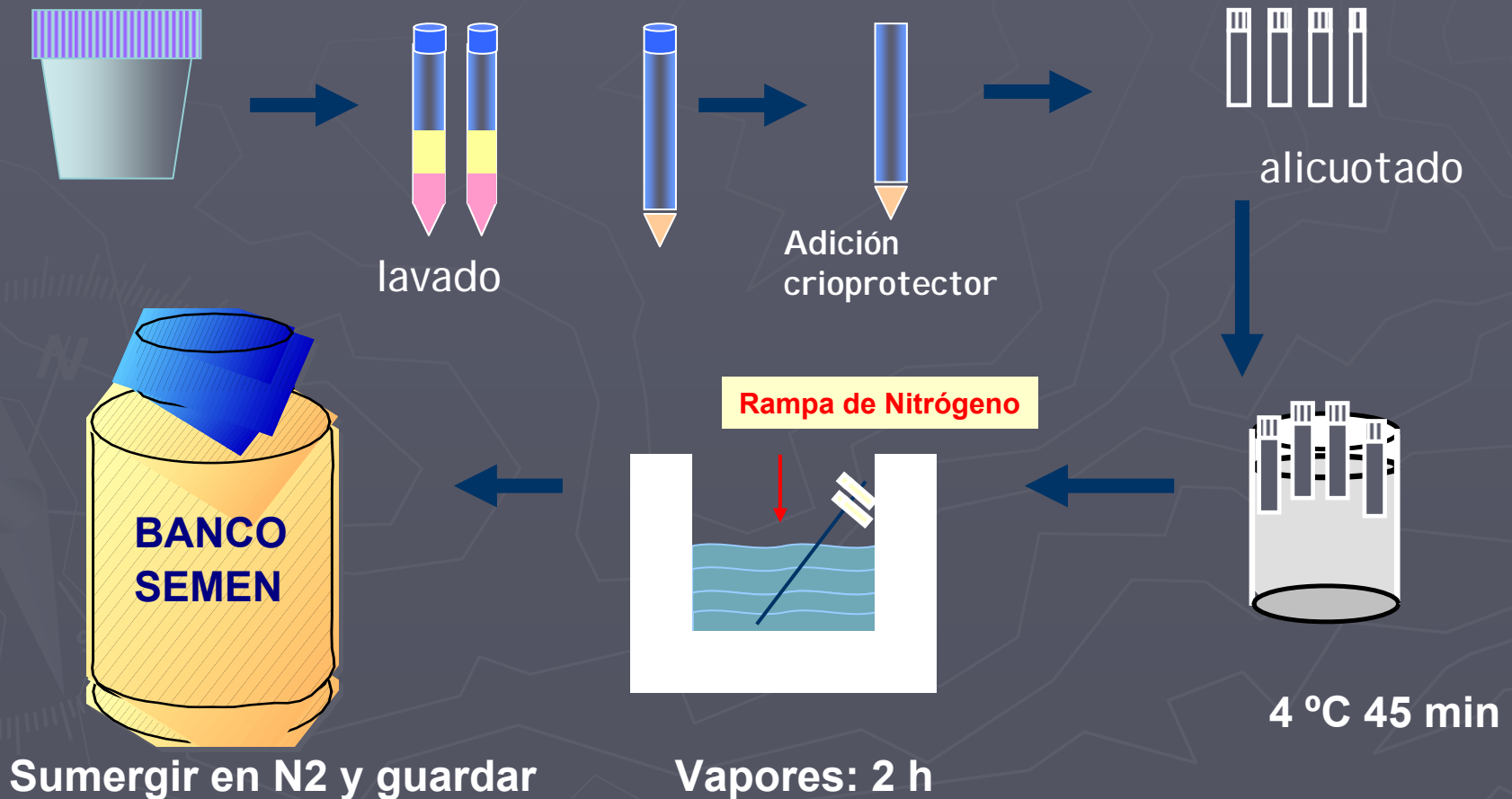
Vapores de Nitrógeno

Hielo seco

Descenso lento de T°C

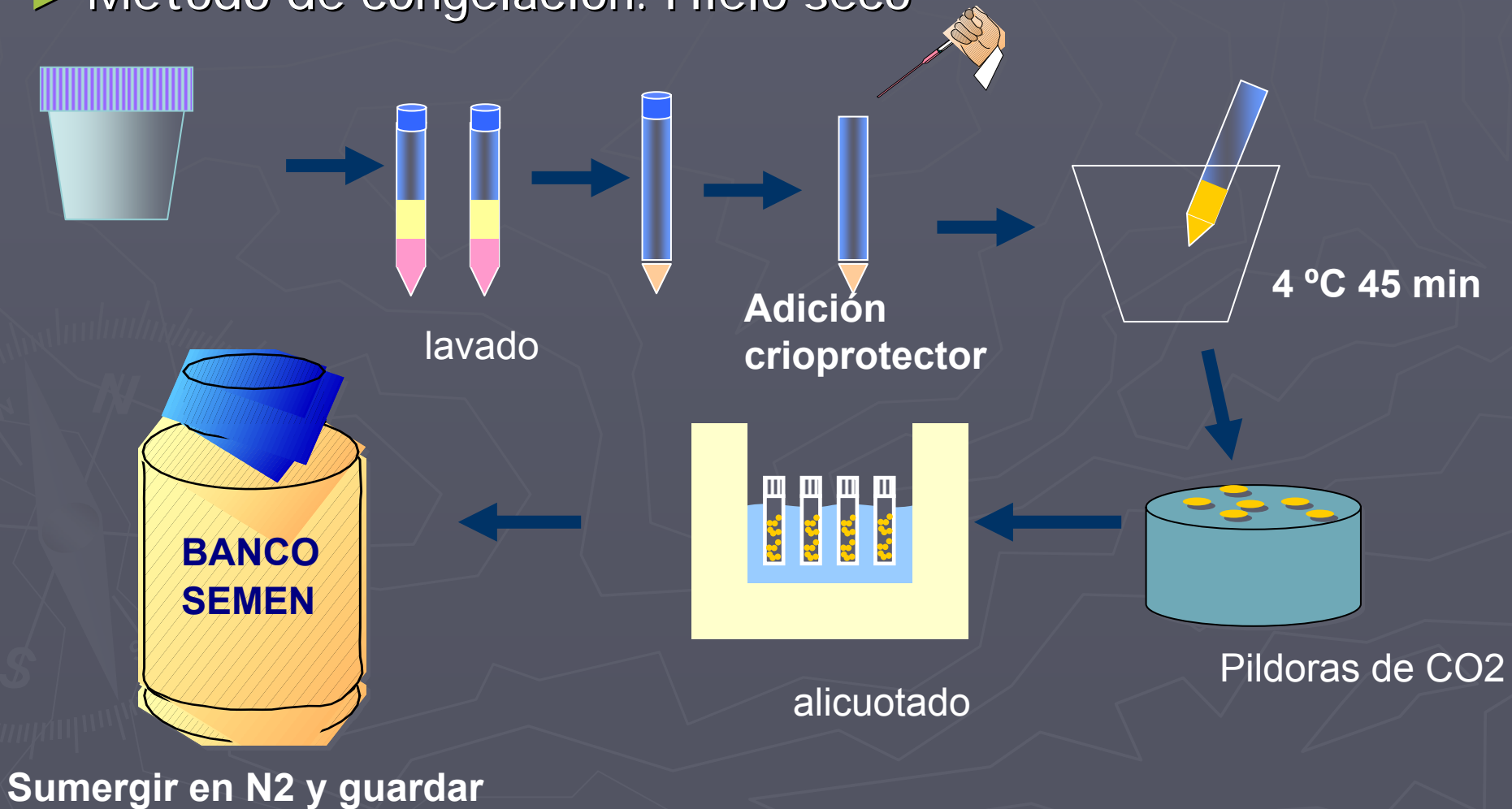
CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

► Método de congelación. Vapores de Nitrógeno



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

► Método de congelación. Hielo seco



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

- Protocolo de congelación lenta
- Utiliza un congelador biológico programable
 - Equipo programable que permite un estricto control de las condiciones para bajar la T^a fracciones de grado centígrado por minuto
 - El recipiente de congelación donde colocamos la muestra se conecta a un tanque de nitrógeno líquido
 - Mediante un programa específico y sensores especiales, el ordenador registra la T^a en el interior del recipiente, y según las indicaciones programadas, inyectará vapores de N_2 para bajar la T^a



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

Método de envasado. Envases

- **Pajuelas**
- **Criotubos o crioviales**
- **Ampollas**
- **Gobelets o criotubos**

TODOS tienen sus ventajas e inconvenientes, por lo que la decisión de emplear uno u otro depende de las necesidades de cada laboratorio

CRI OPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

CONGELACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO

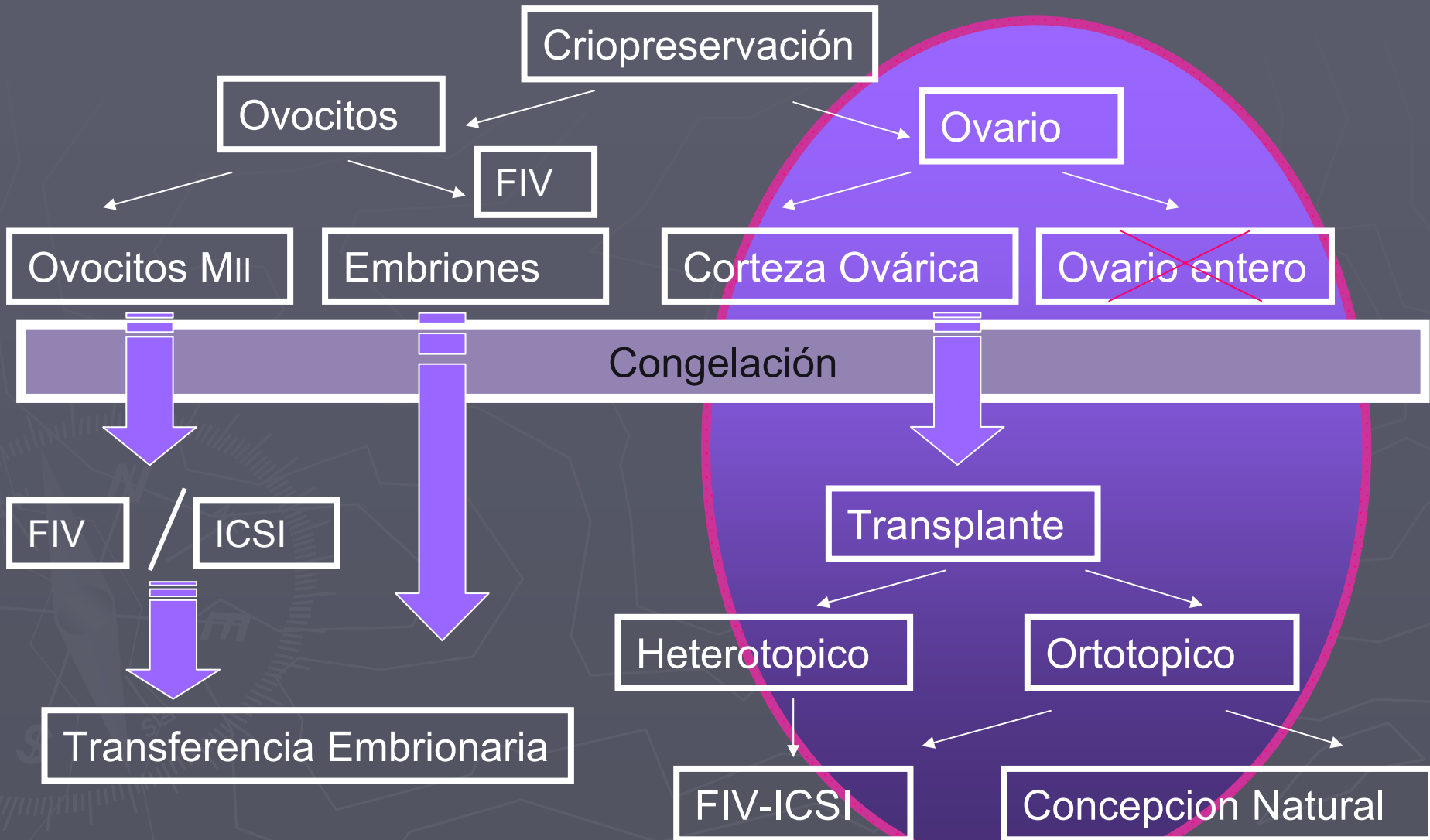
- ▶ 1/650 niños desarrollará un cáncer.
- ▶ Incidencia de cáncer infantil está aumentando, pero también la esperanza de vida.
- ▶ En 2010: 1/250 jóvenes de 20-29 años será superviviente de cáncer infantil.
- ▶ Trat. Antineoplásicos (sobre todo alquilantes y radiación ionizante) producen gonadotoxicidad dando lugar a FOP.
- ▶ Gonadotoxicidad relacionada con: edad, agente terapéutico y la dosis.

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

Indicaciones

- ▶ Mujeres con cáncer, enf autoinmune, cirugía
- ▶ Mujeres sin pareja (jóvenes)
- ▶ Parejas que no quieren congelar embriones – evitar conflictos éticos con embriones congelados

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

- ▶ Gran cantidad de folículos primordiales en la corteza ovárica
- ▶ Se cree que los folículos primordiales son menos sensibles a la criopreservación por su bajo metabolismo (profase de meiosis I)
- ▶ Flujo vascular garantizado por la arteria ovárica.
- ▶ Al descongelar y reinsertar se restaura la función endócrina y la fertilidad (a diferencia de la congelación de ovocitos o embriones)
- ▶ No depende del ciclo menstrual ni requiere estimulación ovárica
- ▶ La médula jugaría un papel en el desarrollo folicular y esteroidogénesis

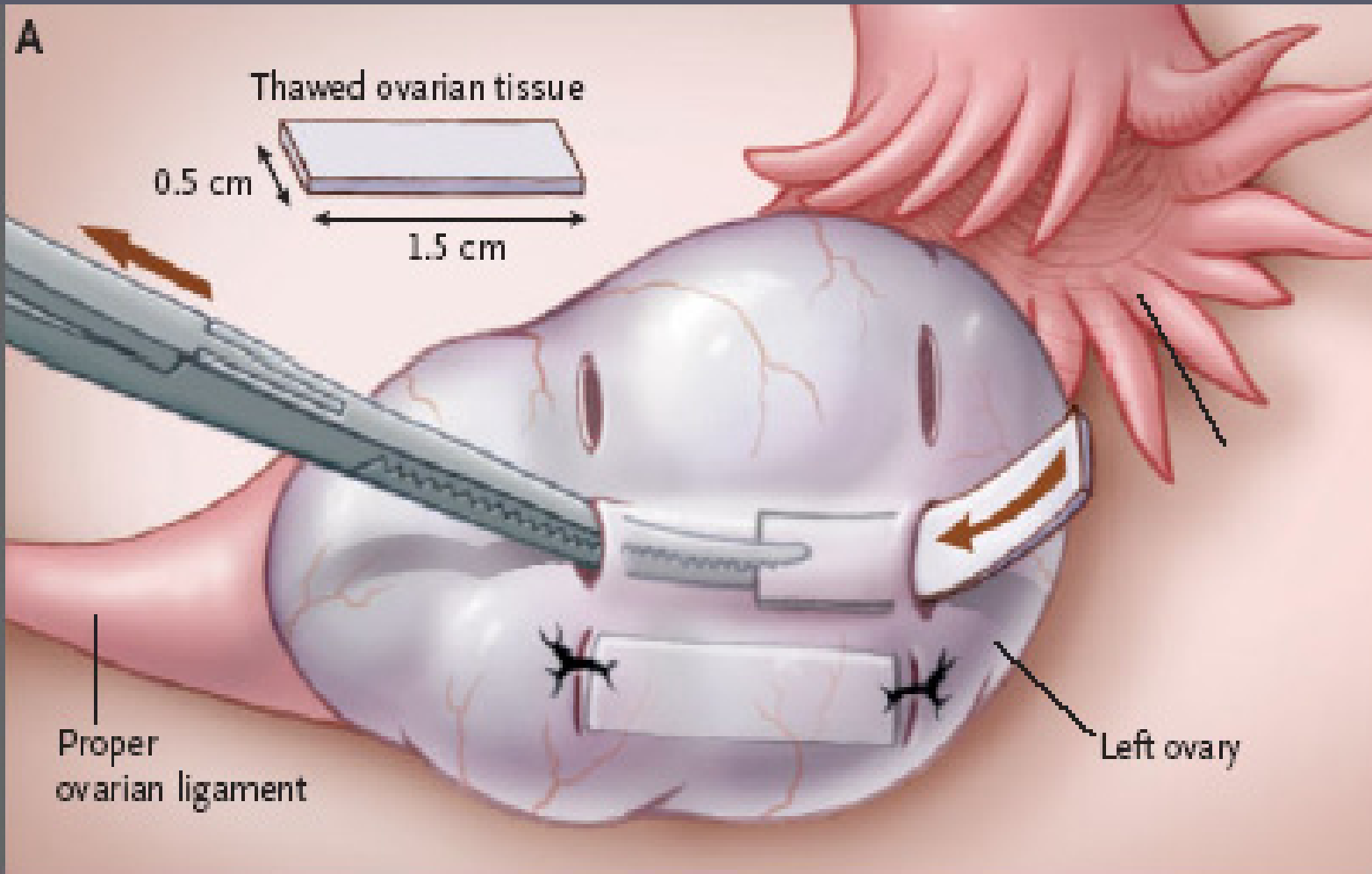
CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

- ▶ Los trasplantes restauran la fertilidad pero tienen una duración limitada, por tanto, aconsejan que los trasplantes se hagan justo cuando se tengan deseos reproductivos.

La pérdida folicular es debida a:

- ▶ proceso de congelación-descongelación 7%
- ▶ proceso de re-vascularización 65 %

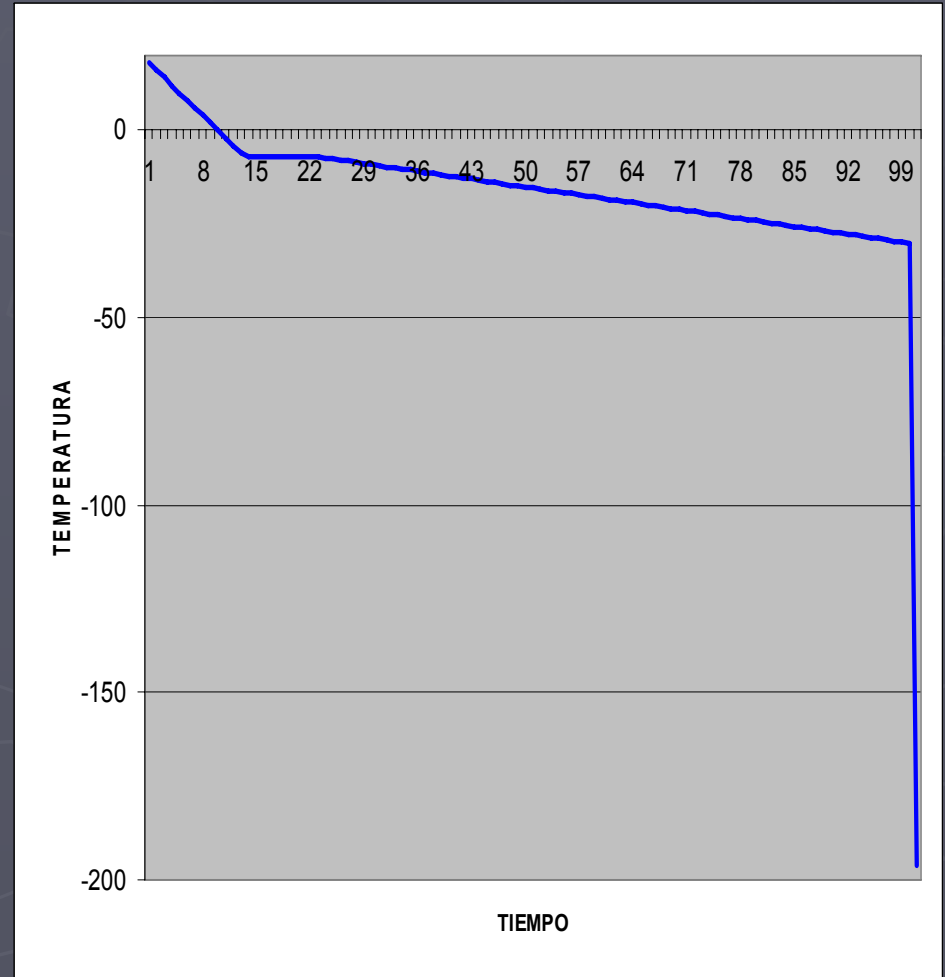
CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio



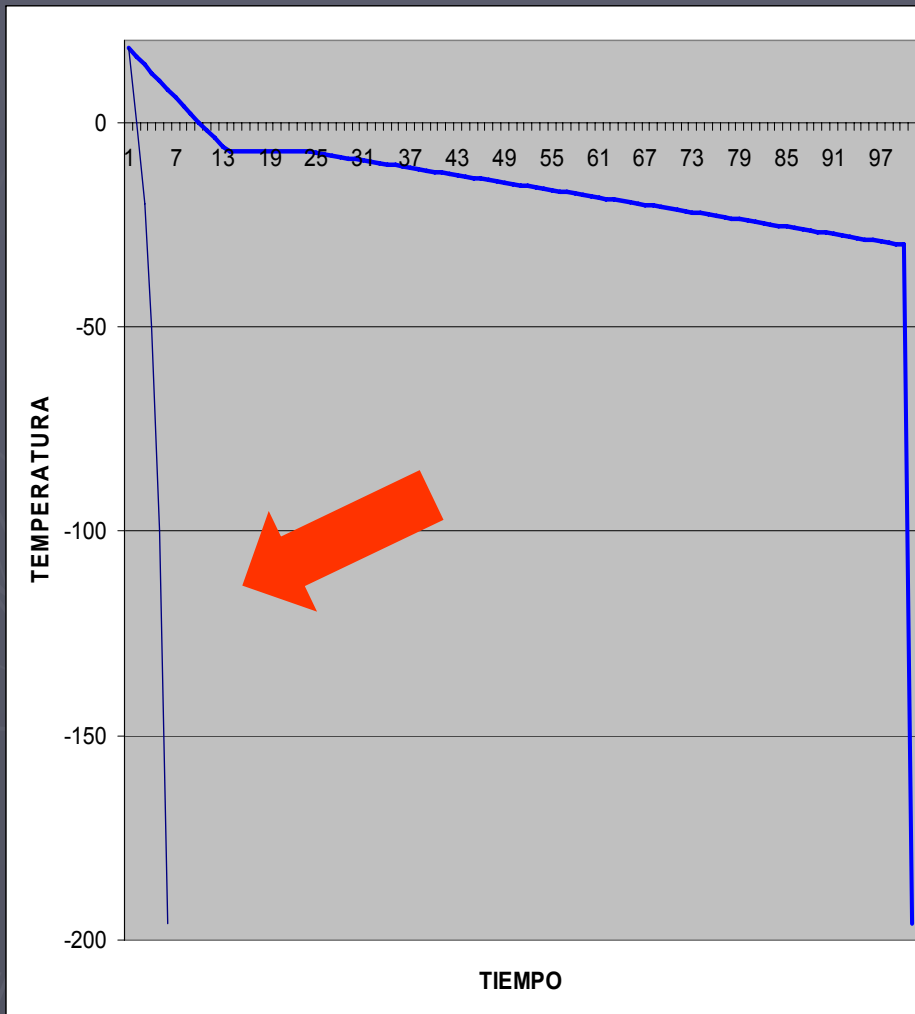
CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

CONGELACIÓN LENTA:

- ▶ T^a inicio: 18 °C – 0 °C
 - ▶ 2-3 °C/min
 - ▶ T^a seeding: -7 °C
 - ▶ 0.3 °C / min hasta – 30 ó -40 °C
 - ▶ Descenso rápido hasta – 150 °C
-
- ▶ Intercambio agua-crioprotector (dmso + sac , proh + sac)
 - ▶ DESHIDRATACIÓN CELULAR



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio



- ▶ VITRIFICACIÓN:
- ▶ Altas concentraciones de crioprotectores que inducen la solidificación de la muestra, SIN formación de cristales, por elevación de la viscosidad durante el enfriamiento (DMSO, PROH, EG, SAC)
- ▶ Ultrarrápida, por inmersión directa en N₂ líquido. Entre 15000 y 30000 °C/min.
- ▶ Alta conc crioprotectores con muy poco volumen

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

VITRIFICACIÓN

- ▶ Técnica de criopreservación basada en el enfriamiento rápido de las soluciones crioprotectoras, sin formación de cristales de hielo.
- ▶ Requiere una alta concentración de crioprotectores.
- ▶ Las mejoras de esta técnica se logran disminuyendo el volumen de medio en el que se vitrifica, permitiendo disminuir notablemente la concentración de los crioprotectores



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

CONGELACIÓN

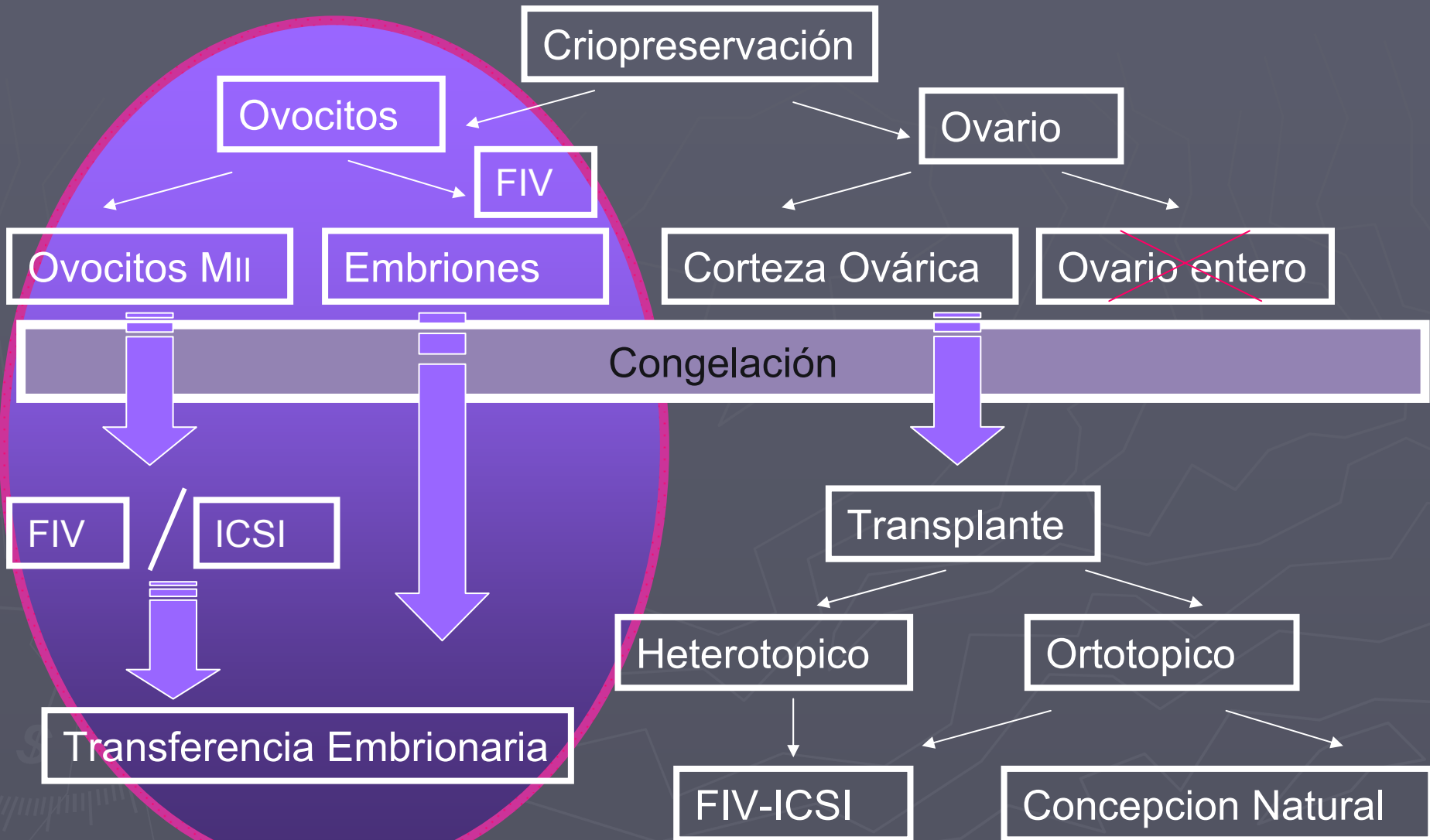


VITRIFICACIÓN

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

Hovatta	1996	Slow freezing	PROH-sacarosa DMSO
Newton	1996	Slow freezing	Glicerol, PROH, DMSO, EG
Gook	1999	Slow freezing	PROH
Hreinsson	2003	Slow freezing	PROH
Schmidt	2004	Slow freezing	EG-Sacarosa
Ramihi, Isachenko	2004	Vitrificación	Glicerol, EG, DMSO

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

INDICACIONES

- ▶ Conservación de la fertilidad en mujeres con riesgo de perder su función gonadal (quimio/ radioterapia, cirugía)
- ▶ Prolongación de la fertilidad en mujeres que postergan la maternidad
- ▶ Facilidad en la gestión de donación de ovulos
- ▶ Alternativa para pacientes que por distintos motivos (éticos, morales, religiosos) no quieren congelar embriones
- ▶ Solución al problema del alto nº de embriones almacenados en bancos
- ▶ Salvar y rentabilizar un ciclo en el que se detecte cualquier incidencia que impida la transferencia de embriones(SHO, imposibilidad de recoger semen, etc)

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

HISTORIA

La experiencia con congelación se remonta a mediados de los años 80

Chen y cols. 1986, 1988

Van Uem y cols 1987

Tucker y cols. 1998

Porcu y Fabbri 1997, 1998, 1999

Marina y cols. 2002

Fossas y cols. 2003

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

- ▶ Célula grande (130um)
- ▶ Distribución y organización de organelas citoplasmáticas
- ▶ Gran área superficie/volumen
- ▶ Célula detenida en M I I con organización característica de los cromosomas
- ▶ Célula con alto contenido de agua intracelular



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

- ▶ CAMBIOS MORFOLÓGICOS
 - ▶ ZP
 - ▶ Gránulos corticales
 - ▶ Membrana plasmática

- ▶ CAMBIOS EN EL CITOESQUELETO
 - ▶ Huso meiótico
 - ▶ Microfilamentos de actina
 - ▶ Alteración en el transporte de calcio

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y
TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

METODOLOGÍA Y PROTOCOLOS

CONGELACIÓN LENTA - DESCONGELACIÓN
RÁPIDA

CONGELACIÓN LENTA - DESCONGELACIÓN
LENTA

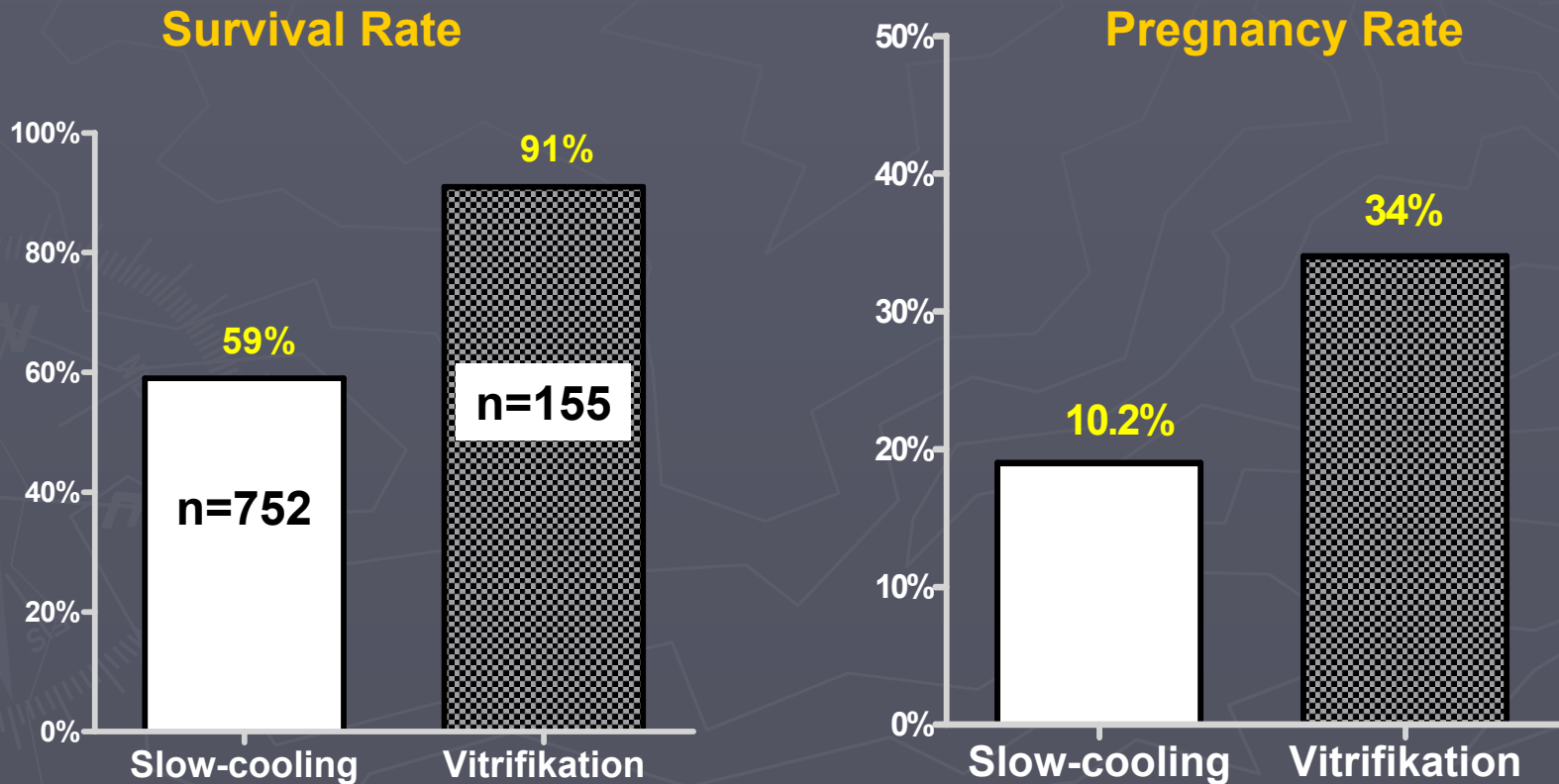
VITRIFICACIÓN

CRI OPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

vitri	Sup	Fec	Trans	Gestac	Implant	RNV
Kuwayama 2005	91% (58)	89,7% (52)	29	41,4% (12)	41,4% (transfer de 1 emb)	7 + 3 en curso
Lucena 2005	89% (120)	87,2% (105)	23	56,5% (13)	?	13 en curso
Antinori 2007	99% (330)	92,9 (305)	120	32,5% (39)	13,2%	3 + 28 en curso

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

Lübeck Results (till 07/2006)



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

▶ VENTAJAS TÉCNICAS

Buenos resultados

Rápida

No necesita congelador biológico

➤ DESVENTAJAS TÉCNICAS

Soportes y almacenamiento

Criotubo

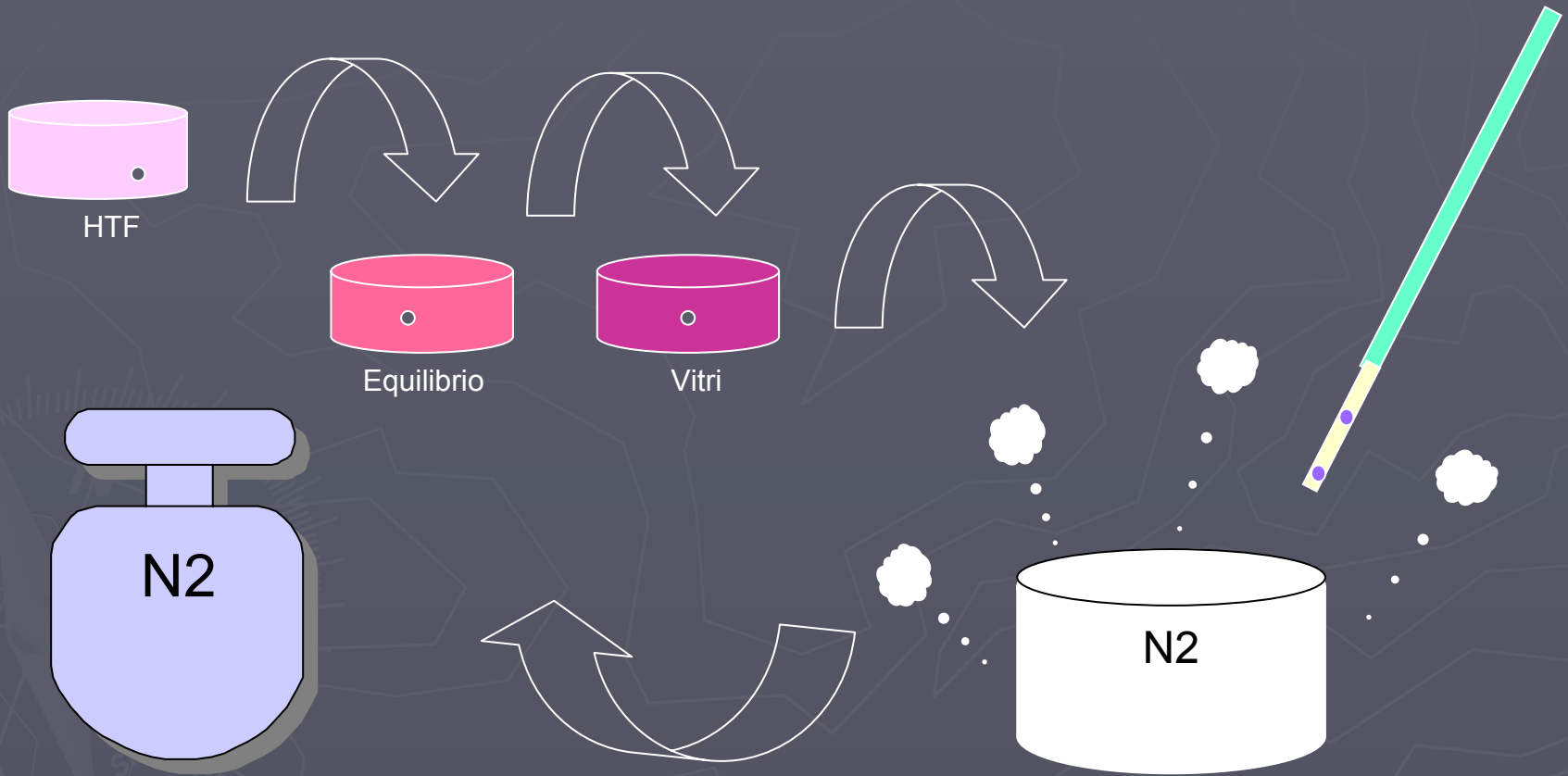
Pajuelas abiertas

Hemistraw system

Cryoloop

Cryotop

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio



CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

CONCLUSIONES

- ▶ Slow freezing vs Vitricificación
- ▶ Tiras de corteza ovárica
- ▶ Duración limitada del trasplante
- ▶ Auto trasplante Ortotópico
- ▶ Baja eficacia hasta el momento

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS, EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO: Aspectos del laboratorio

CONCLUSIONES

- ▶ Vitrificación ofrece excelentes tasas de supervivencia, es rápido y barato, pero requiere experiencia y falta estandarizar
- ▶ Será el procedimiento de elección en el futuro

MUCHAS GRACIAS

Lic. Florencia Gimenez

Dr. Ramiro Quintana