

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
  - a. Título.
  - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
  - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
  - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
  - e. Introducción.
  - f. Material y métodos.
  - g. Resultados.
  - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
  7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
  8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
    - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaria de SAMeR: info@samer.org.ar

## Efecto de la criopreservación sobre la integridad del ADN del oocito

Rocío S laizzo,<sup>1</sup> Claudio Ruhlmann,<sup>1</sup> Natalí S Riva,<sup>1</sup> Graciano Tessari,<sup>1</sup> Federico Domínguez,<sup>2</sup> Mariana Artola,<sup>1</sup> A Gustavo Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fertilidad San Isidro. Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Universidad Maimónides. Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2016;31:23-27

### Resumen

*La criopreservación de oocitos es una herramienta importante en la reproducción asistida. El objetivo del presente estudio fue comparar el posible daño del ADN sobre oocitos humanos metafase II provocado por congelamiento lento y vitrificación. Se emplearon 80 oocitos en metafase II divididos en 3 grupos: 20 oocitos no criopreservados; 30 oocitos sometidos a congelamiento lento (propilenglicol+sacarosa); y 30 oocitos vitrificados (Cryotop). Se evaluó sobrevida y apoptosis celular, comparando los resultados empleando el test de Chi cuadrado. No se encontraron diferencias en la recuperación de los oocitos post-criopreservación: congelamiento lento 26/30 (87%) y vitrificación 29/30 (97%). La sobrevida post-criopreservación fue significativamente mayor en los oocitos vitrificados que en los congelados (21/29=72%*

*vs 12/26=46%). Al evaluar la apoptosis celular con técnica de TUNEL, los oocitos congelados presentaron un nivel de fragmentación del ADN significativamente mayor que los vitrificados y los no criopreservados (4/12=33% vs 0/21=0% vs 0/20=0%). Este estudio sugiere que la vitrificación es un método más eficiente que el congelamiento lento, la tasa de recuperación es mayor y, además, genera menor daño en el material hereditario. Por ello creemos que representa una alternativa muy apropiada para la criopreservación de oocitos.*

**Palabras claves.** Vitrificación, congelamiento lento, sobrevida, apoptosis.

### Impact of cryopreservation on oocyte DNA integrity

#### Summary

*Oocyte cryopreservation has become an important tool in the field of reproductive medicine. The objective of this study was to compare the possible*

**Correspondencia:** Gustavo Martínez  
Correo electrónico: agmartinez@fibertel.com.ar

*DNA damage in metaphase II human oocytes caused by slow freezing and vitrification. A total of 80 metaphase II oocytes were collected, and split into 3 groups: 20 not cryopreserved; 30 cryopreserved using the slow freezing technique (propylenglycol and sucrose); and 30 oocytes cryopreserved using vitrification technique (Cryotop). Oocyte survival and cellular apoptosis were evaluated, comparing results using the Chi Squared Test. No significant differences were found in post-cryopreservation oocyte retrieval: slow freezing 26/30 (87%) and vitrification 29/30 (97%). We observed a significantly higher oocyte survival rate in the vitrification group compared to those in the slow freezing group (21/29=72% vs 12/26=46%). Cellular apoptosis was evaluated using the TUNEL technique, and showed that slow freezing oocytes had significantly higher DNA fragmentation levels than vitrification oocytes and non cryopreserved oocytes (4/12=33% vs 0/21=0% vs 0/20=0%). This study suggests that vitrification is a more efficient technique than slow freezing, not only for its higher oocyte survival rates, but for its safety in the impact on DNA material. This is why we believe it represents an accurate alternative for oocyte cryopreservation.*

**Key words.** *Vitrification, slow freezing, survival, apoptosis.*

## Introducción

La criopreservación de oocitos se ha convertido en una herramienta importante en el campo de la reproducción asistida. Esta técnica es empleada en aquellas pacientes que desean preservar su fertilidad por razones sociales, o porque se someterán a un tratamiento quimioterápico o a cirugías potencialmente riesgosas para el ovario (Schattman, 2015).

Sin embargo, la criopreservación de oocitos presenta algunas dificultades que derivan en bajas tasas de sobrevida post-criopreservación y bajas tasas de fecundación luego de realizar ICSI (Gualtieri y col, 2009).

Los primeros intentos de criopreservación de oocitos se realizaron empleando técnicas de congelamiento lento, las cuales permiten la formación de cristales que dañan la estructura celular (Chen y col, 2003). Recientemente se han desarrollado diversos métodos de vitrificación, que permiten que la solución forme una fase vítrea al entrar en

contacto con el nitrógeno líquido (-196°C) evitando la formación de cristales dañinos. A partir de ello se ha logrado aumentar la tasa de éxito en la criopreservación de oocitos, contándose en miles los niños nacidos en todo el mundo a partir de esta técnica (Paramanatham y col, 2015).

Algunos estudios han demostrado que los procedimientos de criopreservación pueden producir efectos adversos en la ultraestructura celular e inducir la apoptosis en el oocito (Men y col, 2003).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el posible impacto sobre el ADN de oocitos humanos metafase II provocado por el congelamiento lento y por la vitrificación.

## Materiales y métodos

Se emplearon oocitos de 30 pacientes que firmaron el consentimiento de donación para investigación de los oocitos no empleados en sus tratamientos de fecundación *in-vitro*.

## Obtención de los oocitos

Todas las pacientes fueron estimuladas con rFSH sola (*Gonal-F, Merck-Serono, Alemania*; o *Puregon, MSD, Holanda*) o combinada con HMG (*Menopur, Ferring, Suecia*). Se administró una dosis inicial de 150 a 300 IU internacionales de gonadotrofinas durante 5 días, ajustándola de acuerdo a la respuesta ovárica. Al alcanzar un diámetro folicular promedio de 14 mm o niveles de estrógenos de 300 pg/ml se administró una dosis diaria de antagonista de GnRh para evitar el incremento endógeno de la LH (*Cetrorrelix, Cetrotide NR, Merck-Serono, Alemania*) hasta el momento de la descarga folicular. Se administró una dosis simple de 10.000 IU de HCG (*Gonacor 5000, Ferring Pharmaceuticals, Suiza* o *Pregnyl, MSD, Holanda*) 34-36 hs antes de la aspiración folicular.

Los oocitos recuperados fueron colocados en *G-IVF plus® (Vitrolife, Suecia)*. Dos horas después de la aspiración folicular los oocitos fueron criopreservados. Antes de ello, se removieron las células del cúmulo oóforo mediante acción enzimática (*Hyaluronidase, Origio, Dinamarca*) y mecánica empleando pipetas de vidrio.

Un total de 80 oocitos en etapa de metafase II fueron divididos en dos grupos experimentales y un grupo control para la evaluación de la supervivencia y la apoptosis.

- Grupo control: 20 oocitos no criopreservados.
- Grupo 1: 30 oocitos sometidos a congelamiento lento.
- Grupo 2: 30 oocitos sometidos a vitrificación.

### Congelamiento lento

Se utilizó el protocolo descrito por Fabbri y col (2001). Los oocitos fueron equilibrados en una solución 1,5 M de propilenglicol con 0,3 M de sacarosa (15 minutos a temperatura ambiente), luego fueron cargados individualmente en pajuelas de 0,25 ml y mantenidos en la máquina de congelamiento lento a 22°C por minuto. El congelamiento se logró mediante el descenso de la temperatura desde 20°C hasta -6°C a -1°C/minuto; inducción de la nucleación; luego sosteniendo la temperatura a -6°C por 10 minutos; enfriando a -30°C a -0,3°C/minuto y luego a -33°C a -0,1/minuto; arrojándose por 2 minutos a -33°C y, por último, vertiendo las pajuelas en nitrógeno líquido (LN2) para su mantenimiento. El descongelamiento se realizó a temperatura ambiente durante 10 segundos y luego sumergiendo las pajuelas en agua a 37°C por 30 segundos. El crioprotector fue removido en 3 pasos, utilizando soluciones de propilenglicol en concentraciones decrecientes (1, 0,5 y 0 M) suplementado con 0,3 M de sacarosa (5 minutos por cada paso).

### Vitrificación de los oocitos

La vitrificación se realizó siguiendo el protocolo de Kuwayama y col (2005). Los oocitos fueron expuestos a las soluciones de vitrificación en dos etapas. En el primer paso, los oocitos fueron expuestos a la solución de equilibrio (*Kitazato*, Japón) durante 10-15 minutos. Entonces, los oocitos fueron expuestos a la solución de vitrificación (*Kitazato*, Japón), luego de lo cual los oocitos fueron cargados en forma individual en los soportes *Cryotop* (*Kitazato*, Japón) dentro de los 60 segundos. Para la desvitrificación los *Cryotop* con los embriones fueron expuestos a tres soluciones con concentración decreciente de crioprotector (*Kitazato*, Japón).

### Evaluación de la supervivencia

Una vez recuperados luego del proceso de criopreservación, los oocitos fueron transferidos a medio de cultivo *G-IVF plus*<sup>®</sup> (*Vitrolife*, Suecia)

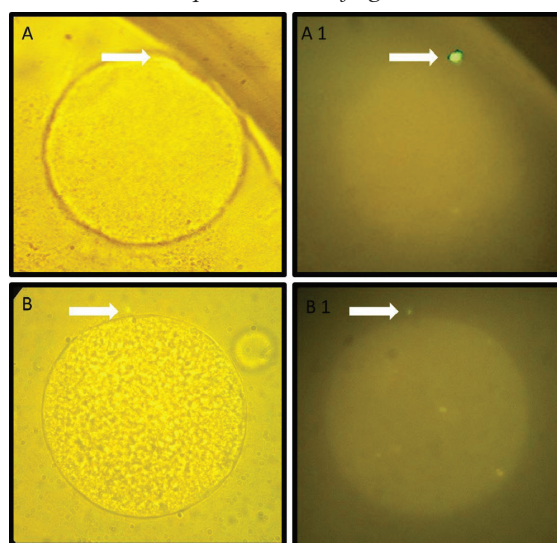
y después de 2 horas de incubación, se evaluó la tasa de supervivencia utilizando un microscopio invertido. Aquellos oocitos con forma esférica, membranas intactas, zona pelúcida intacta y citoplasma uniforme y claro fueron considerados sanos y vitales.

### Evaluación de la apoptosis celular

Para la detección de la muerte celular programada, se implementó el ensayo de TUNEL (*Brisson and Schultz*, 1997), utilizando el *Cell Death Detection Kit* (*Roche*, Alemania), el cual permite identificar mediante la marcación fluorescente la presencia de cortes en el ADN doble cadena.

Se realizó la digestión de la zona pelúcida empleando una solución de ácido *Tyrodes* (*Irvine Scientific*, EE.UU.) y fijados en microgotas de 5 µl de formaldehído al 37% (*Sigma*, EE.UU.) cada 100 µl de *G-MOPS*<sup>®</sup> (*Vitrolife*). Los oocitos fueron luego depositados en portaobjetos con pocillos (*EMS*, EE.UU.) previamente lavados con poli-L-lysina 0,1% (*Sigma*). Después de varios lavados en *PBS* (*Gibco*, *Grand Island*, New York, EE.UU.), fueron tratados con metanol durante 1,5 minutos, lavados nuevamente con PBS y expuestos a una solución de bloqueo en un ambiente húmedo a 4°C durante 45-60 minutos.

**Figura 1.** Marcación fluorescente de oocitos empleando la técnica de TUNEL para detectar la fragmentación de ADN.



A: Control positivo sin filtro UV. A1: Control positivo con filtro UV. B: Control negativo sin filtro UV. B1: Control negativo con filtro UV.

Luego, los oocitos fueron incubados en la solución de TUNEL (Roche, Alemania) en un ambiente húmedo a 37°C durante una hora según las instrucciones del fabricante. Los oocitos control negativo fueron incubados sólo en solución fluorescente sin enzima para asegurar la ausencia de etiquetado. Para el control positivo, un número de oocitos fue incubado con DNAsas durante una hora y luego fueron tratados con solución de TUNEL. A cada pocillo se le añadieron 5 µl del agente de montaje Vecta-shield (VectorLab) y se examinaron los portaobjetos bajo aceite de inmersión usando un microscopio de fluorescencia (Mikoba).

Aquellos oocitos con marcación fluorescente brillante en el núcleo fueron considerados con ADN fragmentado (Figura 1).

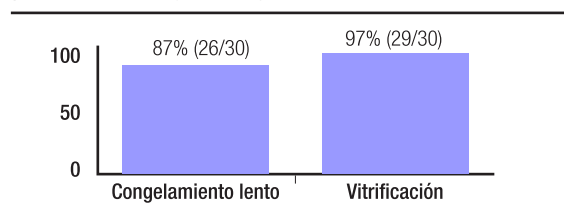
### Análisis estadístico

Las diferencias en las tasas de viabilidad y la apoptosis de los oocitos en los grupos experimentales y control fueron analizados empleando el test de Chi<sup>2</sup>. El valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

### Resultados

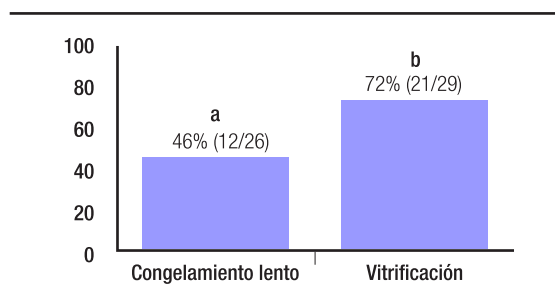
No se encontraron diferencias en la recuperación de oocitos post-criopreservación: congelamiento lento 26/30 (87%) y vitrificación 29/30 (97%) (Figura 2).

**Figura 2.** Tasa de recuperación de oocitos luego del congelamiento lento y la vitrificación.



Se observó una sobrevida post-criopreservación significativamente mayor en el grupo de oocitos vitrificados (21/29 = 72%) que en el grupo de oocitos congelados (12/26 = 46%) (Figura 3).

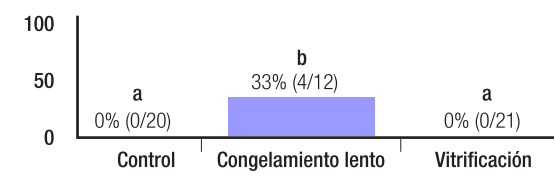
**Figura 3.** Tasa de sobrevida de los oocitos luego del congelamiento lento y la vitrificación.



(a, b) Difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Al evaluar la apoptosis celular se observó que aquellos oocitos sometidos al congelamiento lento presentaron un nivel de fragmentación del ADN significativamente mayor (4/12 = 33%) que los vitrificados (0/21 = 0%) y los no criopreservados (0/20 = 0%) (Figura 4).

**Figura 4.** Tasa de apoptosis celular de los oocitos luego del congelamiento lento y de vitrificación comparado con los oocitos no criopreservados (control).



(a, b) Difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

### Discusión

Diversos autores han demostrado que la vitrificación no sólo es más simple, sino que es más eficaz que el congelamiento lento para la criopreservación de oocitos (Levi Setti y col, 2014; Vajta and Nagy, 2006), alcanzando mayores tasas de sobrevida. Nuestros resultados coinciden con estos reportes ya que en la comparación de la sobrevida luego del uso de ambas técnicas se encontró una tasa de sobrevida significativamente mayor luego de la vitrificación (72% vs 46%). El hecho que la vitrificación evite la formación de cristales de hielo aporta ventajas físicas que reducen el daño producido sobre los oocitos (Vajta and Kuwayama, 2006).



El proceso de congelamiento lento puede causar daños irreversibles en el oocito, como endurecimiento de la zona pelúcida, la liberación anticipada de los gránulos corticales, despolimerización de los microtúbulos y desalineamiento de los cromosomas (Khalili y col, 2012), lo cual puede ser evitado empleando la vitrificación.

Nuestro trabajo muestra diferencias en la integridad del ADN tras la criopreservación por vitrificación comparada con el congelamiento lento. Esto coincide con los hallazgos de Men y col, quienes mostraron que los oocitos bovinos sometidos a congelamiento lento presentaban un aumento en la degeneración celular y fragmentación de ADN vía apoptosis (Men y col, 2003). Esto podría estar relacionado con los diversos efectos que el congelamiento lento provoca sobre las funciones celulares y moleculares (Gook y Edgar, 2007).

Gualtieri y col obtuvieron resultados similares en oocitos humanos empleando la técnica de TUNEL (Gualtieri y col, 2009).

En conclusión, hemos demostrado que la sobrevivencia luego de la criopreservación fue mayor en los oocitos vitrificados que en los sometidos a congelamiento lento. La proporción de oocitos con ADN fragmentado fue mayor en aquellos preservados mediante congelamiento lento, mientras que los oocitos vitrificados y los no criopreservados no presentaron fragmentación del ADN.

Este estudio sugiere que la vitrificación es un método más eficiente que el congelamiento lento, ya que no sólo la tasa de recuperación es mayor, sino que además es más eficiente ya que produce menor daño en el material hereditario. Por ello creemos que presenta una alternativa muy apropiada para la criopreservación de oocitos.

## Referencias

1. Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 1997; 56: 1088-1096.
2. Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing - A review article. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 28: 101-107.
3. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: New perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001; 16: 411-416.
4. Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 591-605.
5. Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril* 2009; 91: 1023-1034.
6. Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril* 2009; 91: 1023-1034.
7. Khalili MA, Maione M, Palmerini MG, Bianchi S, Macchiarelli G, Nottola SA. Ultrastructure of human mature oocytes after vitrification. *Eur J Histochem* 2012; 56: e38.
8. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300-308.
9. Levi Setti PE, Porcu E, Patrizio P, Vigilano V, de Luca R, d'Aloja P, Spoletini R, Scaravelli G. Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007-2011. *Fertil Steril* 2014; 102: 90-95.
10. Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology* 2003; 47: 73-81.
11. Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 245.
12. Paramanathan J, Talmor AJ, Osianlis T, Weston GC. Cryopreserved oocytes: update on clinical applications and success rates. *Obstet Gynecol Surv* 2015; 70: 97-114.
13. Schattman GL. Clinical practice. Cryopreservation of oocytes. *N Engl J Med* 2015; 29: 1755-1760.
14. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006; 65: 236-244.
15. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 779-796.