



# 1<sup>ER</sup> CAMPUS SEF

Preservación de la Fertilidad

24 de marzo 2017  
Hotel AC Atocha  
Madrid

[www.sefertilidad.com](http://www.sefertilidad.com)

**FERRING**

PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

Secretaría técnica:

**Fase20**  
Farmacéutica

C/ Narvaez 15 1º Izq - 28009 Madrid  
Tel. 902 430 960 - Fax: 902 430 959  
info@fase20.com - www.fase20.com

 @Sefertilidad

# Principios de criopreservación de corteza ovárica

Clara González Llagostera

# Introducción

2004 Primer nacimiento. 2017 ~60  
 2004- Vitrificación de ovocitos y embriones  
 Vitrificación de tejido ovárico?  
 2 Nacidos vivos

**Table 1** Series of 60 live births after transplantation of frozen-thawed ovarian cortex

	Cryopreservation procedure	Number of transplanted women desiring pregnancy	Number of live births (..)=ongoing pregnancies
Donnez and Dolmans et al.	SF	19	8 (+1)
Meirow et al.	SF	NA	6
Demeestere et al.	SF	NA	3
Andersen's et al.	SF	25	8
Silber et al.	SF	6	4
Piver et al. and Roux et al.	SF	NA	3 (+1)
Pellicer et al.	SF	33	6 <sup>a</sup> (+3)
Revel et al.	SF	NA	2
Dittrich et al.	SF	20	6
Revelli et al.	SF	NA	1
Callejo et al.	SF	NA	1
Stern, Gook, and Rozen	SF	14	3 <sup>a</sup>
Kawamura and Suzuki et al.	VF	NA	2
Burneister and Kovacs, et al.	SF	2	1
Rodriguez-Wallberg and Hovatta et al.	SF	NA	1
Tanbo et al.	SF	2	2
Agarwal et al. <sup>b</sup>	SF	NA	1
Makolkin et al., and Kalugina et al. <sup>b</sup>	SF	NA	2

J Assit Reprod Genet (2015) 32:1167-1170



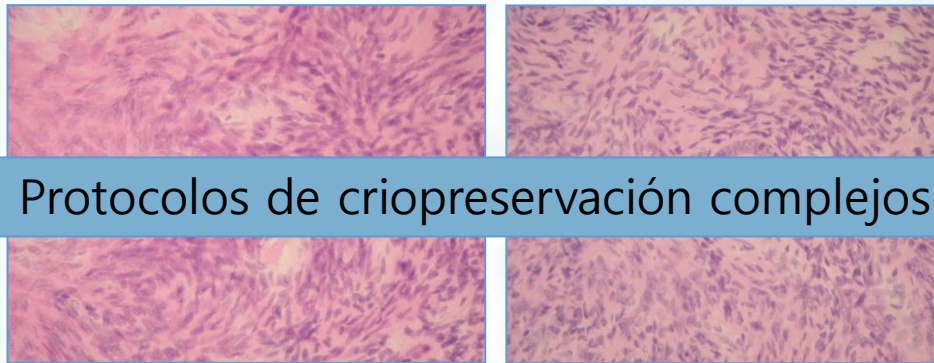
## Corteza ovárica

Distintos tipos celulares.

- Parénquima.
- Estroma fibroso.
- Folículos

Diferentes requerimientos:

- Concentraciones óptimas de crioprotectores para prevenir cristales hielo.
- Tiempos de equilibración.
- Tasas de enfriamiento/calentamiento.



Protocolos de criopreservación complejos

Folículos primordiales en cortical ovárica  
Dr. Francesc Tresserra. Quirón-Dexeus, Barcelona

## Criopreservación

1. Condiciones de transporte del tejido

4. Protocolo de criopreservación

2. Tamaño de los fragmentos del tejido

3. Soporte para la criopreservación (criotubo, bolsa EVA, rejilla metálica)

## 1. Transporte de la muestra al laboratorio:

- En frío 4-8°C
- Reportado desde RT (Chang *et al*, 2011) hasta 37°C (Suzuki *et al*, 2015)

## 2. Tamaño de los fragmentos:

Menor tamaño →



- fácil penetrancia de los crioprotectores
- mayores tasas de enfriamiento y calentamiento



- reduce el tiempo de isquemia
- ¿rotura de folículos?
- dificultad para la cirugía de trasplante

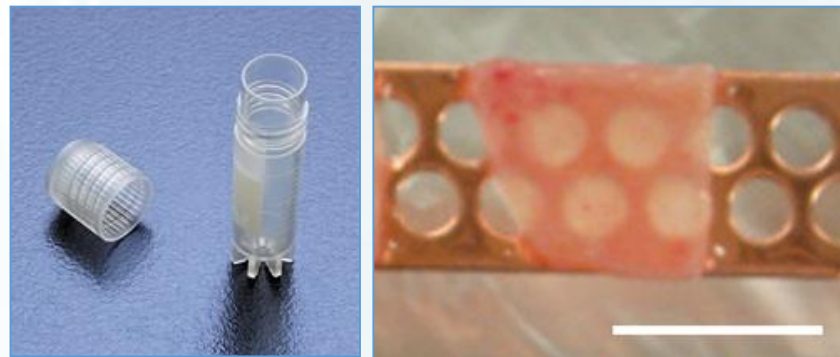
### 3. Soporte utilizado:

- Crioviales
- Rejillas metálicas
- Bolsas de etil vinil acetato



Riesgo de contaminación cruzada en sistemas abiertos.

¿Esterilización de nitrógeno?  
¿Soporte cerrado?



Kuwayama 2009, cryotissue



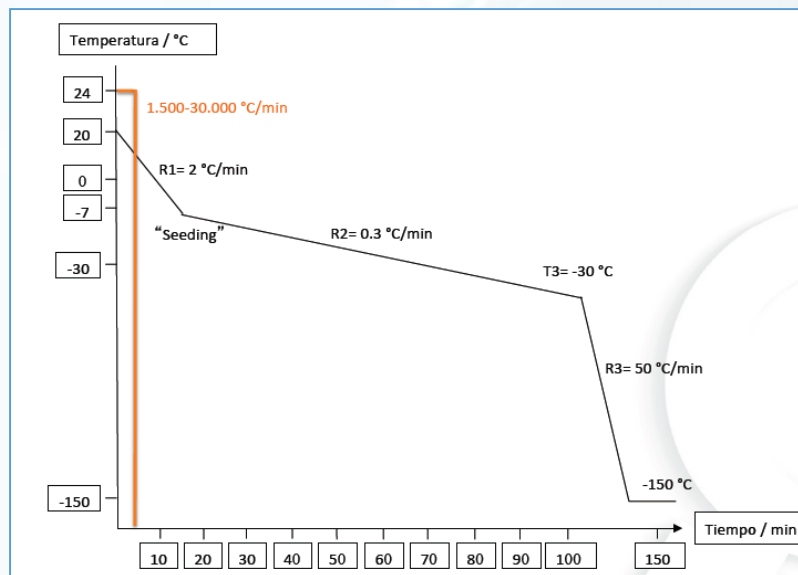
## 4. Protocolo:

### Congelación lenta (SF)



vs

### Vitrificación (VF)



Congelación lenta

Vitrificación

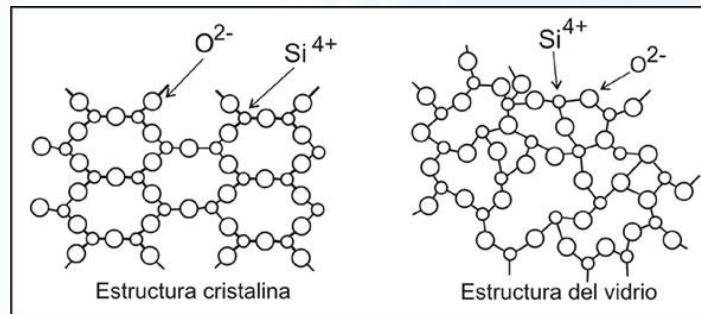


## Congelación lenta

- Tasa de enfriamiento lenta.
- Deshidratación celular moderada.
- Baja concentración de crioprotectores.
- Formación de cristales de hielo.
- Equipo específico.
- Costoso económicamente.
- Protocolo largo.
- No realizable en quirófano.

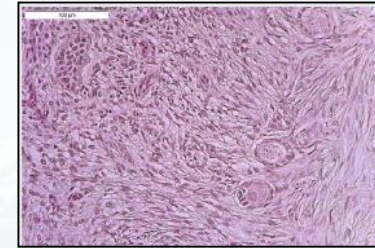
## Vitrificación

- Tasa de enfriamiento ultra rápida.
- Deshidratación celular importante.
- Elevadas concentraciones de crioprotector.
- No existe formación de cristal, es un sólido en estado amorfo.
- No requiere equipo específico.
- Protocolo sencillo y rápido.
- Realizable en quirófano.



## Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices

Sonia Herraiz, Ph.D.,<sup>a,b</sup> Eurne Novella-Maestre, Ph.D.,<sup>a,b,c</sup> Beatriz Rodríguez, B.Sc.,<sup>a,b,d</sup> César Díaz, M.D.,<sup>a,b,d</sup> María Sánchez-Serrano, Ph.D., M.D.,<sup>e</sup> Vicente Mirabet, Ph.D.,<sup>f</sup> and Antonio Pellicer, Ph.D., M.D.<sup>a,b,d</sup>



Objetivos: Determinación del protocolo y soporte óptimo de criopreservación.  
Variables estudiadas: Densidad folicular, proliferación y viabilidad estroma celular.

Preservación de folículos quiescentes VF superior a SF.  
→ Mantenimiento del injerto.

## **Comparison of vitrification and conventional slow freezing for cryopreservation of ovarian tissue with respect to the number of intact primordial follicles**

### **A meta-analysis**

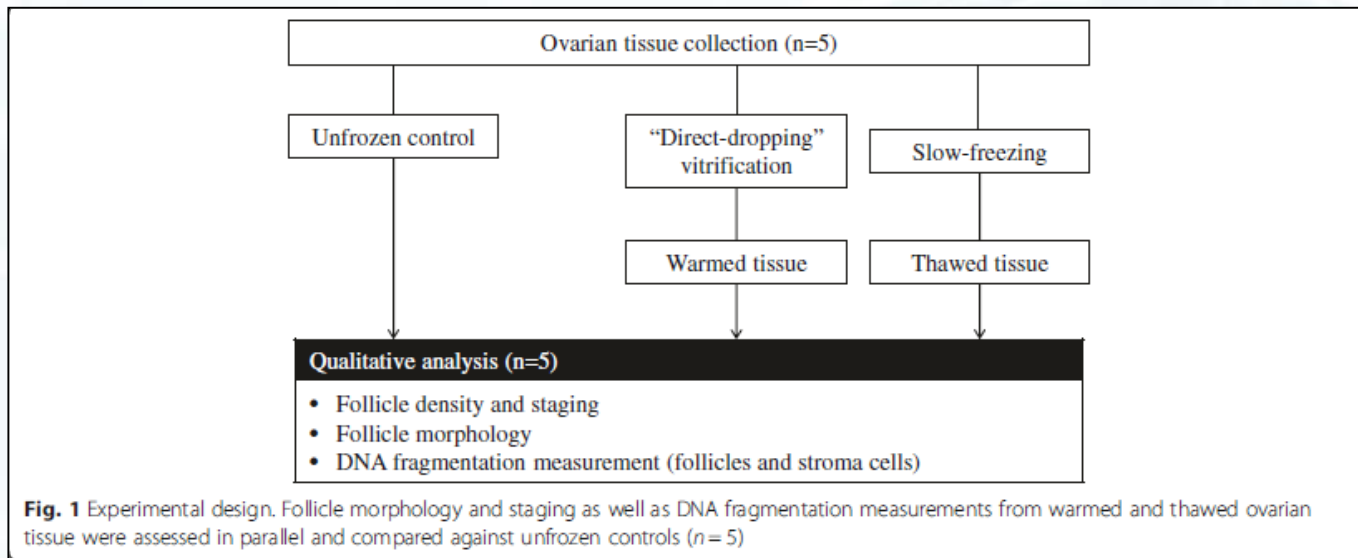
Xin-Hui Zhou, PhD<sup>a</sup>, Dan Zhang, MD, MS<sup>a</sup>, Jin Shi, MD, MS<sup>a</sup>, Yi-Jun Wu, PhD<sup>b,\*</sup>

Vitrificación y congelación lenta presentan resultados equivalentes respecto a número de folículos primordiales intactos.

- Variabilidad protocolos.
- ¿Determinación del protocolo óptimo?

## Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing

Sandra Sanfilippo<sup>1,2\*</sup>, Michel Canis<sup>1,2</sup>, Johan Smitz<sup>3</sup>, Benoît Sion<sup>4</sup>, Claude Darcha<sup>5</sup>, Laurent Janny<sup>2,6</sup> and Florence Brugnon<sup>2,6</sup>



Resultados comparables.

Vitrificación ofrece ventajas en simplicidad y coste.



## Técnicas combinadas

### Combined strategy for fertility preservation in an oncologic patient: vitrification of *in vitro* matured oocytes and ovarian tissue freezing

Clara González • Marta Devesa • Montserrat Boada  
Buenaventura Coroleu • Anna Veiga • Pere N. Barri

J Assist Reprod Genet, 2011;28:1147-1149.

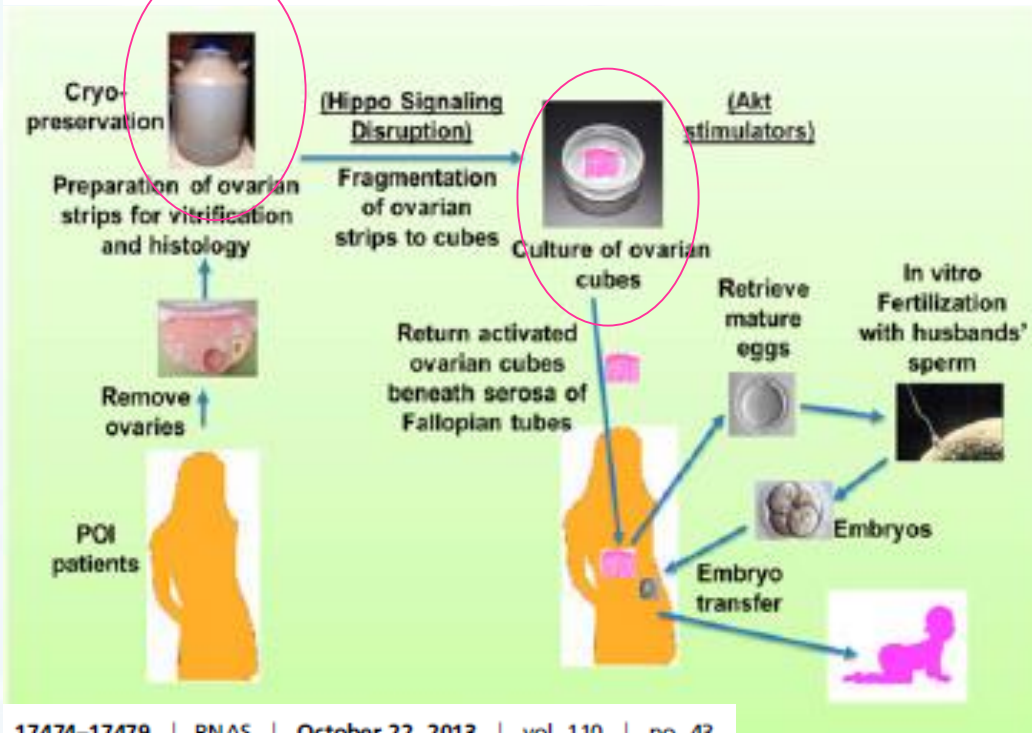
### Cryopreservation of *in vitro* matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in paediatric female cancer patients before and after cancer therapy

R. Abir<sup>1,\*</sup>, I. Ben-Aharon<sup>2</sup>, R. Garor<sup>1</sup>, I. Yaniv<sup>3</sup>, S. Ash<sup>3</sup>, S.M. Stemmer<sup>2</sup>,  
A. Ben-Haroush<sup>1</sup>, E. Freud<sup>4</sup>, D. Kravarusic<sup>4</sup>, O. Sapir<sup>1</sup>, and B. Fisch<sup>1</sup>

Hum Reprod, 2016;31:750-762.

## Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment

Kazuhiro Kawamura<sup>a,b,1,2</sup>, Yuan Cheng<sup>c,1</sup>, Nao Suzuki<sup>a</sup>, Masashi Deguchi<sup>c</sup>, Yorino Sato<sup>a,c</sup>, Seido Takae<sup>a,c</sup>, Chi-hong Ho<sup>c</sup>, Nanami Kawamura<sup>b,d</sup>, Midori Tamura<sup>a</sup>, Shu Hashimoto<sup>e</sup>, Yodo Sugishita<sup>a</sup>, Yoshiharu Morimoto<sup>e</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>f</sup>, Nobuhito Yoshioka<sup>a</sup>, Bunpei Ishizuka<sup>d,2</sup>, and Aaron J. Hsueh<sup>c,2</sup>



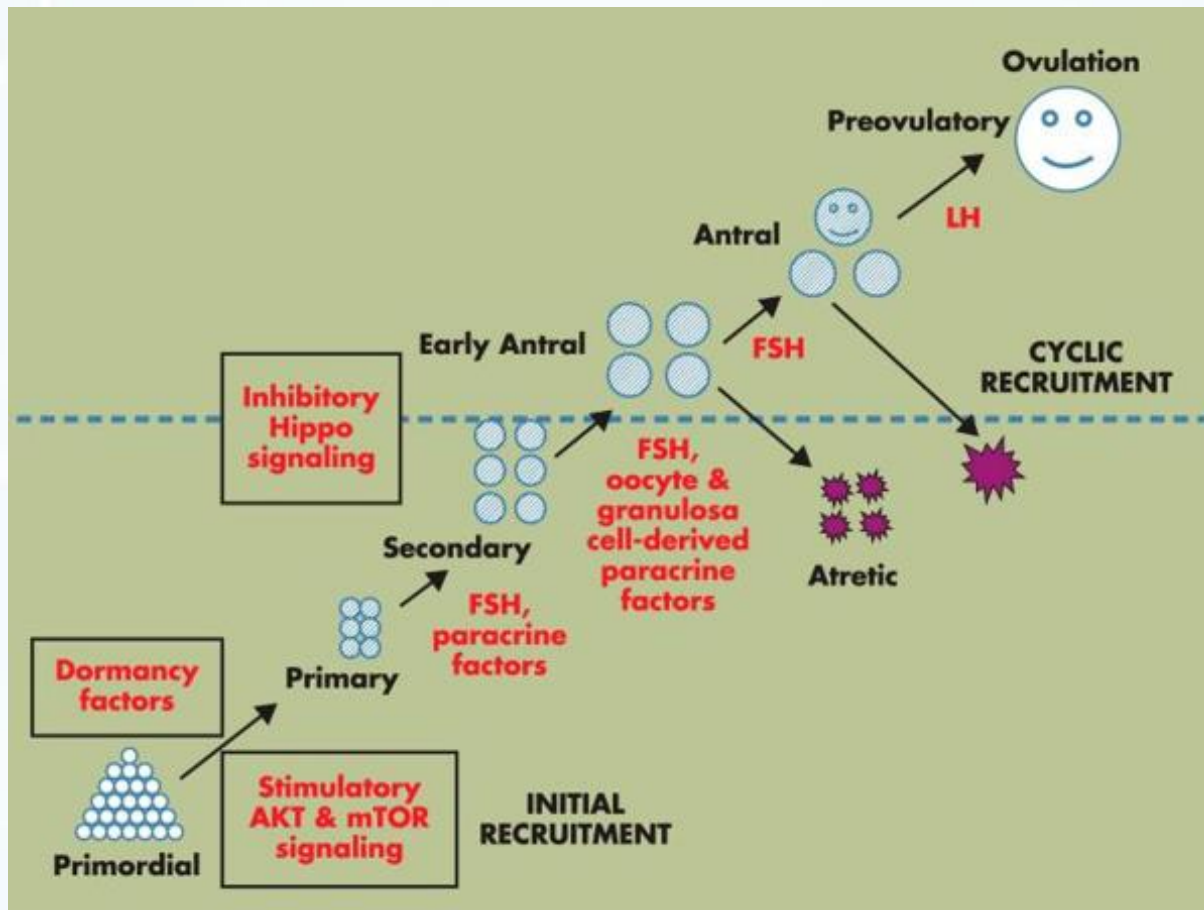
17474-17479 | PNAS | October 22, 2013 | vol. 110 | no. 43

La fragmentación de la corteza ovárica per se, actúa como catalizador de la activación de los folículos primordiales. Disrupción de la vía de señalización inhibidora Hippo.

Activación vía PI3K-PTEN-AKT-FOXO3. Activación crecimiento fols primordiales.

# 1<sup>ER</sup> CAMPUS SEF

Preservación de la Fertilidad  
24 de marzo 2017 Hotel AC Atocha / Madrid





## Conclusiones

### **Criopreservación tejido ovárico (SF/V), técnica buen rendimiento:**

- Mantenimiento densidad folículos primordiales
- Morfología folicular
- Preservación de folículos quiescentes

**Fácilmente realizable. ¿Problema sistemas abiertos? No disponible sistemas cerrados (vitrificación).**

### **Investigación con el objetivo de:**

Estandarizar protocolos de criopreservación

Seguimiento a largo plazo de los niños nacidos a partir de to\*

### **Valorar estrategias combinadas:**

- crio de tejido con crio de ovocitos MIV.
- cultivos in vitro de activación folicular.



# 1<sup>ER</sup> CAMPUS SEF

Preservación de la Fertilidad  
24 de marzo 2017 Hotel AC Atocha / Madrid

Muchas gracias



 @Sefertilidad  
[www.sefertilidad.com](http://www.sefertilidad.com)