



# "Vitrificación versus congelación lenta en la criopreservación de tejido ovárico: una revisión bibliográfica."

Ciclo de Metodología científica II - 2023

Grupo 78

**Autores:** María Florencia Acosta Percovich <sup>1</sup>, Francisco Javier Antunez Sequeira <sup>1</sup>, Belén María Patiño Ganduglia <sup>1</sup>, Juan Pablo Perdomo Barros <sup>1</sup>, Leandro Martín Perez Bonnin <sup>1</sup>, Francisco María Prandi Odela <sup>1</sup>, Dana Kimelman <sup>2</sup>, Rebeca Chávez <sup>3</sup>, Gabriel Anesetti <sup>3</sup>.

1. Ciclo de Metodología Científica II 2023 - Facultad de Medicina- Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
2. Unidad Académica de la Clínica Ginecitológica B, Hospital de Clínicas - Facultad de Medicina - Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
3. Unidad Académica del Departamento de Histología y Embriología - Facultad de Medicina - Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

**Facultad de Medicina - Universidad de la República**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	5
3. Objetivos.....	7
4. Metodología .....	8
5. Resultados.....	10
6. Discusión.....	19
7. Conclusiones y perspectivas.....	21
8. Agradecimientos.....	22
9. Referencias bibliográficas .....	22
10. Anexos.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1 - Flujograma del proceso de selección de estudios .....	9
2. Tabla 1 - Características poblacionales y del protocolo utilizado .....	11
3. Tabla 2 - Aspectos morfológicos y funcionales del tejido utilizado.....	14
4. Tabla 3 - Resultados post reimplante... ..	18

## RESUMEN

**Introducción:** Desde el año 2004 se encuentra disponible en Uruguay el protocolo de criopreservación de tejido ovárico sin fines reproductivos en el Instituto Nacional de Donación y Trasplante (INDT). La técnica de criopreservación que se utiliza para criopreservar el tejido desde el inicio de este programa; es la congelación lenta. La vitrificación es una técnica más reciente e innovadora, y la evidencia en cuanto a su efectividad es limitada en la literatura científica. Existen diferencias entre ambas técnicas, respecto a los procedimientos, costos, equipamiento y personal necesario para su realización.

**Objetivo:** Justificar y promover la aplicación de la técnica con mejores resultados y cuya aplicación sea más costo-efectiva.

**Materiales y métodos:** Se realizó una revisión narrativa mediante una exhaustiva búsqueda bibliográfica en diferentes portales científicos, seleccionando artículos de investigaciones sobre criopreservación de tejido ovárico humano por ambas técnicas, publicados entre 2013-2023.

**Resultados:** Se encontró que los tejidos criopreservados por congelación lenta y vitrificación no presentaban diferencias respecto a la preservación de sus características histológicas, viabilidad folicular o cantidad de fragmentación de ADN. Se obtuvieron resultados exitosos para ambas técnicas luego de la reimplantación del tejido ovárico criopreservado. La mayoría de las pacientes lograron recuperar sus ciclos menstruales y alcanzar niveles hormonales normales; y se registraron casos de embarazos y nacimientos vivos.

**Conclusiones:** Luego de realizar una revisión narrativa identificamos que las técnicas son comparables en cuanto a su efectividad. No obstante, con la evidencia disponible hasta ahora la vitrificación podría considerarse una técnica más rentable. Las conclusiones obtenidas en esta revisión podrán ser de utilidad para el planteo de una actualización del protocolo de criopreservación de tejido ovárico utilizado en nuestro país.

**Palabras clave:** oncofertilidad, tejido ovárico, criopreservación, congelación lenta, vitrificación.

## SUMMARY

**Introduction:** Since 2004, the Uruguayan institute called: Instituto Nacional de Donación y Trasplante (INDT) developed an ovarian tissue cryopreservation protocol with non reproductive purposes. Slow freezing is the cryopreservation technique currently employed by the institute. Vitrification proves to be a more recent and innovative technique. However, evidence regarding its effectiveness is limited. These techniques differentiate themselves in terms of procedure, costs, equipment and personnel required to carry them out.

**Objective:** To justify and eventually promote that technique which grants the best results and whose clinical application is the most cost efficient.

**Material and methods:** An narrative review and exhaustive bibliographic research was conducted through different academic search engines; selecting articles regarding cryopreservation of human ovarian tissue by both techniques, published between 2013 and 2023.

**Results:** Both slow frozen and vitrified tissues have not shown differences concerning the preservation of their histological characteristics, follicular viability and DNA fragmentation. Successful results were obtained after the reimplantation of cryopreserved tissue, by both techniques. Most patients were able to regain their menstrual cycles and achieve normal hormone levels; a number of pregnancies and live births have been recorded to date.

**Conclusions:** We have identified that the techniques are comparable in terms of effectiveness. Nonetheless, evidence obtained so far suggests that vitrification could be considered as a more cost-effective technique. Conclusions achieved through this research may be of use when updating the ovarian tissue cryopreservation protocol in our country.

**Key words:** oncofertility, ovarian tissue, cryopreservation, slow freezing, vitrification.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el avance en los tratamientos oncológicos ha mejorado las tasas de supervivencia de pacientes oncológicos en general. Sin embargo; dichos tratamientos determinan ciertos efectos adversos, entre ellos el potencial daño gonadotóxico que puede darse en personas con ovarios y/o testículos. Es por esto que se deben considerar posibles estrategias para lograr mejorar la calidad de vida de los sobrevivientes. La oncofertilidad es un área de la medicina que une la oncología con la medicina reproductiva buscando principalmente proteger la salud reproductiva de pacientes que enfrentan enfermedades oncológicas en la infancia, y/o la juventud (1).

Un aspecto a considerar en las personas con ovarios es la preservación de la función hormonal ovárica y de la fertilidad. Como alternativas para solucionar esta problemática se han planteado diversas estrategias para preservar tanto la función hormonal como la capacidad reproductiva en las pacientes en edad pediátrica, adolescentes o adultas jóvenes (2).

Algunos ejemplos de estas estrategias son la criopreservación de embriones, ovocitos, y particularmente el foco de este trabajo: la criopreservación de tejido ovárico (3). Podrían beneficiarse de esta última técnica las personas con las siguientes características: pacientes oncológicas en las cuales el tratamiento no puede aplazarse para realizar criopreservación de ovocitos (dos semanas), pacientes que aún no han alcanzado el desarrollo puberal y frente a otras patologías que determinen en sí mismas o por su tratamiento un riesgo de insuficiencia ovárica prematura. La criopreservación de tejido ovárico también se ha planteado como una estrategia de recuperación de la función hormonal ovárica. Este último aspecto es controversial; si bien se ha documentado la recuperación de los ciclos menstruales y función hormonal luego del reimplante, la durabilidad del reimplante es limitada (4).

En la década de 1950 se comenzó a realizar criopreservación de tejido ovárico en modelos animales experimentales. En los noventa se comenzó a criopreservar el tejido de forma exitosa, y en 1999 Oktay y cols. lograron el primer autotrasplante de tejido ovárico criopreservado en humanos. El primer embarazo exitoso luego de autotrasplante de tejido ovárico criopreservado se registró en 2004 (5). Desde entonces se ha expandido su uso a tal punto que ha dejado de considerarse como una técnica experimental a partir de 2019 por la Sociedad Americana de Reproducción Asistida (ASRM) (6).

La técnica se basa en la resección quirúrgica de la corteza ovárica, mediante cirugía mínimamente invasiva (cirugía laparoscópica), con la posterior criopreservación de la muestra mediante técnicas de congelamiento lento o por vitrificación, aspecto central que será

abordado y analizado en esta revisión. Una vez criopreservado el tejido puede mantenerse almacenado en tanques de nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Cuando las pacientes finalizan el tratamiento oncológico, si manifiestan tener deseos reproductivos el tejido podría ser reimplantado (2).

La técnica de congelamiento lento o controlado se basa en la exposición del tejido a bajas concentraciones de agentes crioprotectores, comúnmente Dimetilsulfóxido (DMSO) o Etilenglicol (EG) y en simultáneo realizar un descenso controlado de la temperatura con materiales específicos para este procedimiento. Esta técnica ofrece como limitantes: la posible formación de cristales de hielo intracelulares y el alto costo del equipamiento necesario para su aplicación. Este último es el método utilizado en Uruguay desde la implementación del protocolo de criopreservación de tejido ovárico en el año 2004.

La vitrificación del tejido ovárico consiste en la aplicación de crioprotectores permeables a la membrana celular (como DMSO y EG, ya mencionados) e impermeables generando deshidratación celular, por lo tanto, se evita la formación de cristales de hielo intracelulares favoreciendo la integridad morfológica de las muestras (7). Para realizar la vitrificación puede utilizarse el sistema abierto o el cerrado. En el primero de ellos el fragmento de tejido se coloca directamente sobre un soporte metálico que se sumerge en nitrógeno líquido para su criopreservación. En el sistema cerrado el fragmento se almacena en un soporte de metal de gran conductividad como el titanio (8), que se cubre y se introduce en una bolsa sellada antes de sumergirlo en el nitrógeno.

Por otro lado; la técnica de congelación lenta ha sido la más utilizada desde el inicio de la criopreservación de tejido ovárico, pero en los últimos años la vitrificación ha generado su lugar. A pesar de que la información clínica disponible es limitada, los resultados en cuanto a la vitalidad del tejido, son prometedores, por lo que varios centros de reproducción asistida en el mundo como en Japón y Estados Unidos, comenzaron la transición de congelamiento lento hacia la vitrificación (9). En Brasil, es la técnica más utilizada, llegando a realizarse en el 93% de los centros de reproducción asistida con programas de criopreservación de tejido ovárico (10).

El objetivo de nuestro trabajo es realizar un estudio comparativo entre ambas técnicas a modo de obtener un análisis sobre su proceder y aplicabilidad a lo largo de los distintos centros dedicados a medicina reproductiva en el mundo, y también comparar los resultados en cuanto a eficacia, costos y accesibilidad.

## **OBJETIVOS**

- 1- Analizar y comparar ventajas y desventajas de la técnica de vitrificación y la congelación lenta en la criopreservación de tejido ovárico.
- 2- Evaluar la aplicabilidad de la vitrificación como alternativa a la congelación lenta.
- 3- Exponer los resultados reproductivos reportados en la literatura científica luego del reimplante del tejido criopreservado.

## METODOLOGÍA

Se realizó una revisión narrativa, mediante una búsqueda bibliográfica en las bases de datos Pubmed y Cochrane, utilizando los términos Cryopreservation, Ovarian tissue, Slow freezing y Vitrification como parámetros de búsqueda.

Los criterios de inclusión para los trabajos incluidos en esta investigación fueron: idioma español o inglés, trabajos realizados en humanos y fecha de publicación comprendida entre los años 2013 a 2023; obteniendo una diversa variedad de artículos entre los cuales se priorizaron aquellos cuyos objetivos coinciden o se asemejan a los de nuestro trabajo. A pesar de los filtros aplicados, se excluyeron artículos que igualmente trabajaron con tejido animal, xenotrasplante, pacientes trans, preservación de embriones u ovocitos, por no ceñirse al objetivo.

En PubMed se realizaron cuatro búsquedas basadas en distintas combinaciones de las palabras clave. En la primera se utilizaron las palabras “ovarian tissue cryopreservation”, “vitrification” y “slow freezing” combinados por el comando “AND”. Inicialmente surgieron 127 artículos, a los que se les aplicaron los filtros de tejido ovárico humano donde se redujo el número de trabajos a 71, posteriormente se le aplicó el siguiente filtro temporal para artículos publicados entre 2013-2023 donde el número de resultados quedó determinado en 47. Se seleccionaron 12 artículos siguiendo los criterios expuestos.

Una segunda búsqueda fue guiada por las palabras “cryopreservation”, “ovarian tissue” y “vitrification” combinadas por el comando “AND”. Esta búsqueda mostró 465 trabajos científicos, que al aplicar el criterio temporal y de tejido estudiado se redujeron a 144 resultados. De los 14 elegidos dos son artículos nuevos, los restantes doce coinciden con lo encontrado en la búsqueda anterior.

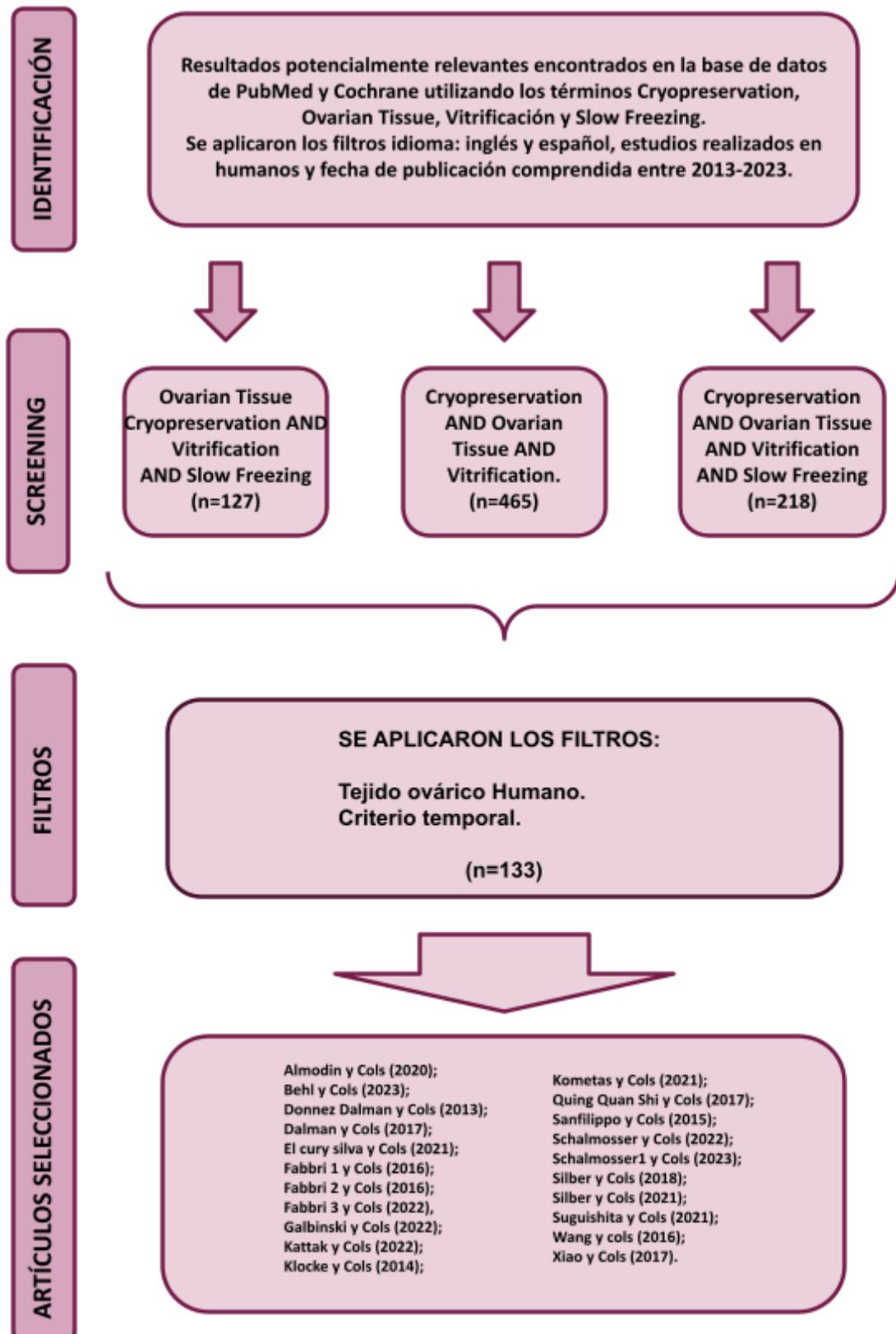
En la tercera búsqueda se utilizaron los términos “cryopreservation”, “ovarian tissue”, “Vitrification” y “slow freezing” combinados con “AND”, donde en primera instancia se obtuvieron 218 artículos. Luego de aplicar los 2 filtros mencionados se obtuvo un total de 79 artículos, siendo doce los de relevancia para nuestro trabajo y coincidiendo con los ya encontrados previamente.

En la cuarta búsqueda se combinaron “ovarian tissue”, “cryopreservation” y “pregnancy” con “AND” para obtener 592 artículos, y aplicando los filtros de criterio temporal y tejido humano se obtuvieron 136 artículos de los que se seleccionaron cuatro nuevos.

En la base de datos de Cochrane se realizó una única búsqueda utilizando como términos guía “cryopreservation”, “vitrification” y “slow freezing” combinados con el comando AND.

Realizada esta búsqueda se obtuvo un número de 58 artículos que con su posterior depuración de acuerdo a los filtros se reducen a 50 trabajos, de los cuales fueron seleccionados 2 dado que muchos coincidían con los resultados obtenidos en la búsquedas realizadas en PubMed. El método utilizado se presenta de forma general en el siguiente esquema.

**Figura 1. Flujoograma del proceso de selección de estudios**



## RESULTADOS

En esta revisión se analizaron un total de 19 artículos obtenidos a partir de los parámetros anteriormente mencionados. Los resultados se organizaron en tres tablas: en la primera de ellas (Tabla 1) se exponen en orden cronológico los artículos incluidos, las características de la población estudiada (patología presentes en las pacientes, técnica por la cuál se extrajo el tejido ovárico y el grosor del mismo) y del protocolo de criopreservación utilizado en cada investigación; en la Tabla 2 se describen los aspectos histológicos y funcionales de los tejidos estudiados, y en la tercera (Tabla 3) se exponen los resultados post reimplante.

La cantidad de pacientes osciló entre 3 y 1026 mujeres por estudio en un rango de edad entre 6 - 48 años, portadoras de patologías benignas y malignas como cáncer de mama, linfoma, leucemia, entre otros.

Cinco de los artículos fueron del tipo de revisiones sistemáticas, el resto referido a estudios experimentales en los que se investigaron distintos aspectos relacionados a las técnicas de criopreservación; congelación lenta y vitrificación.

Trece artículos analizaron y compararon ambas técnicas mientras que de los restantes tres se dedican únicamente al análisis de la congelación lenta (9, 10) y otros tres a la vitrificación (12–14). Como excepción, el estudio de Khattak y cols. (15) se centra en los resultados del reimplante del tejido criopreservado sin hacer distinción de la técnica de criopreservación utilizada.

La técnica de resección del tejido ovárico se describe en catorce de los estudios analizados, la técnica más utilizada fue la ooforectomía parcial del tejido por sobre la resección total. Dentro de los estudios analizados la laparoscopia fue de elección como abordaje quirúrgico en la mayoría de los trabajos.

El grosor del tejido obtenido fue uno de los parámetros con mayor variabilidad de la revisión, siendo desde 1 hasta 7 mm de grosor (2).

**TABLA 1**

**Características poblacionales y del protocolo utilizado**

<b>Autor y año de publicación</b>	<b>Número de pacientes incluidas en estudio (n)</b>	<b>Edad (media/rango)</b>	<b>Patología(s)</b>	<b>Técnica de preservación</b>	<b>Técnica de resección (ooforectomía parcial/total)</b>	<b>Grosor del tejido</b>
Donnez y cols.(2013) (4)	60	No expuesto	Enfermedades hematológicas, enfermedades malignas y patología benigna	Congelación lenta	No informado	No específica
Klocke y cols. (2014) (16)	23	29,9	Patología benigna	Congelación lenta y vitrificación	Resección total	No específica
SanFilippo y cols. (2015) (7)	5	28	No especificado	Congelación lenta y vitrificación	Resección parcial - cirugía endoscópica	5 mm
Fabbri y cols. (2016) (11)	3	32-36-31	No especificado	Congelación lenta	Obtenido por laparoscopia, no específica técnica.	No específica
Fabbri y cols. (2016) (17)	6	14-34	Pacientes oncológicas: linfoma de Hodgkin, cáncer de mama, etc.	Congelación lenta y vitrificación	Tejido de ambos ovarios por laparoscopia	1-3 mm
Wang y cols. (2016) (18)	11	31,8 +/- 8,36	No especificado	Congelación lenta y vitrificación	Tejido ovárico mediante laparoscopia	1 mm
Dalman y cols. (2017) (19)	7	27-38	Paciente sometidas a cesárea electiva	Congelación lenta y vitrificación	Obtenido por cesárea electiva	1 mm
Quinquan Shi y cols. (2017) (17)	14 estudios (157 pacientes)	14-43	No especificado	Vitrificación vs congelación lenta	Laparoscopia/ laparotomía. Resección parcial	No específica
Xiao y cols. (2017) (13)	8	27,2	No especificado	Vitrificación	Ooforectomía parcial (5 ptes) y total (3 ptes)	No especificado

Silber y cols. (2018) (2)	92	24 (6-35 años)	Patología oncológica, insuficiencia ovárica prematura , etc.	Congelación lenta vs vitrificación	Ooforectomía unilateral	1 mm
Almodin y cols. (2020) (14)	6 fragmentos (1 paciente)	No descrito	No especificado	Vitrificación	Ooforectomía total.	1 mm
Kometas y cols. (2021) (20)	9 estudios (media de 11,1 ptes por estudio)	14-48	No especificado	Congelación lenta vs vitrificación	No informados	No específica
El Cury Silva y cols. (2021) (12)	8 estudios (79 pacientes)	20-41	Patología benigna y maligna	Vitrificación	Ooforectomía total (laparoscopia y laparotomía)	Entre 1 - 7 mm
Silber y cols. (2021) (21)	119	1 - 42	Patología oncológica, FOP, causas sociales.	Congelación lenta y vitrificación	Ooforectomía unilateral	1 mm
Sugishita y cols. (2021) (8)	50 piezas de tejido ovárico (5 pacientes)	31	Donantes cadavéricos	Vitrificación (abierta/cerrada) vs congelación lenta	Ooforectomía parcial	1 mm
Fabbri y cols. (2022) (22)	1026	12,9 grupo 1 29,0 grupo 2	Patología oncológica (mama, linfoma, leucemia, sarcomas) y no oncológica (enfermedades genéticas, autoinmunes)	Congelación lenta	Resección de 30-40% de uno o ambos ovarios	2 mm
Gablinski y cols. (2022) (10)	12	34, 6	No especificada	Congelación lenta vs vitrificación con molde metal	Biopsia intraoperatoria laparoscópica	4 mm
Khattak y cols. (2022) (15)	87 estudios (735 pacientes)	No expuesto	Patología oncológica	Resultados de trasplante	No específica	No específica
Schallmoser y cols. (2022) (22)	30	26,7 (14-41)	Patología oncológica (no especificada)	Congelación lenta y vitrificación	Resección parcial por laparoscopia	1mm
Behl y cols. (2023) (26)	19 estudios ( 201 pacientes)	30-40	No especificado	Vitrificación vs congelación lenta	No específica	No específica

Schallmoser y cols. (2023) (23)	20 pacientes	10-35 (27,9)	Preservación de fertilidad	Congelación lenta y vitrificación	Resección parcial por laparoscopia	1 mm
---------------------------------	--------------	--------------	----------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	------

En el siguiente apartado se describirán los resultados correspondientes a los aspectos morfológicos y funcionales del tejido analizado (Tabla 2) .

**Morfología folicular:** Diez de los artículos encontrados incluyeron la morfología folicular como variable de estudio, cuantificando los folículos intactos en el tejido preservado por congelación lenta y vitrificación. No se encontraron diferencias significativas respecto a este parámetro entre ambas técnicas (6, 15–19, 21, 23, 25). Sin embargo, en el tejido preservado por congelación lenta se observó un desprendimiento parcial o total de la membrana basal (6), mientras que en el tejido vitrificado se encontraron algunos núcleos y mitocondrias irregulares, y cromatina levemente engrosada. Los dos tipos de técnicas informaron la presencia de cristales periféricos en las mitocondrias (9).

**Viabilidad folicular:** Al analizar los resultados expuestos sobre la viabilidad celular en artículos donde se compara el método de congelación lenta con el de vitrificación, identificamos que todos los grupos de investigadores utilizan diferente metodología para evaluar la viabilidad celular; sin embargo la literatura es consistente en que no hay diferencias significativas en la viabilidad o integridad celular entre las técnicas de congelación lenta y vitrificación (4, 14–16, 18, 19, 21, 22, 25). Dentro de los aspectos utilizados para evaluar la viabilidad tisular se destaca: la proliferación celular, apoptosis y la actividad mitocondrial entre otras.

Por otro lado, al analizar los artículos que exponen los resultados comparativos de diferentes técnicas de vitrificación, se observa que al utilizar un sistema cerrado con vial de plástico se reportan mayores niveles de apoptosis tisular en comparación con lo que se observó en el tejido ovárico fresco ó el criopreservado con las técnicas de vitrificación por inmersión de aguja. (13)

Por el contrario, el trabajo de Galbisnki y cols. (24) describió una mejor respuesta al estrés térmico en el grupo de congelación lenta, ya que la expresión de HSP70 (proteína que actúa como chaperona ante estrés térmico) en este tejido inducida por criopreservación, es mayor ante el aumento de temperatura.

Fueron encontrados dos artículos que exponen únicamente la técnica de vitrificación y en ambos se describió la preservación de la morfología tisular posterior a la vitrificación (13, 14).

Al comparar el tejido previamente criopreservado con el tejido fresco, uno de los trabajos describe una disminución en el número de folículos intactos para ambas técnicas siendo mayor para el de congelación lenta (10).

**Fragmentación del ADN:** Al analizar la variable fragmentación, tres de los estudios experimentales no reportan diferencias entre las técnicas de criopreservación (5,20,22). Dos de las revisiones incluidas en esta revisión analizan esta variable y tampoco encuentran diferencias entre ambas técnicas (4,18); la revisión de Quingquan Shi y cols. (26) concluye que la fragmentación de ADN es menor en el tejido ovárico vitrificado.

**Tejido estromal:** Según lo expuesto en cuatro de los trabajos analizados; ambas técnicas han demostrado la conservación de la morfología estromal (6, 9, 18, 25). Uno de los estudios no reporta diferencias entre el tejido criopreservado y el tejido fresco, pero describe leve edema intersticial y daño celular en el tejido criopreservado mediante congelación lenta (17). Otro trabajo que evalúa solamente los efectos de la vitrificación (14) reporta la presencia de leve edema y fragmentación citoplasmática pero sin necrosis. La revisión de Behl y cols. (6) obtuvo resultados inconclusos.

**TABLA 2**

**Aspectos morfológicos y funcionales del tejido analizado**

<b>Autor</b>	<b>Viabilidad folicular</b>	<b>Morfología folicular</b>	<b>Tejido estromal</b>	<b>Fragmentación ADN</b>
Klocke y cols (2014) (14)	Tasas similares de proliferación celular y apoptosis luego de cultivo.	Sin diferencias en folículos de alta calidad, en congelación lenta. ( 68,1% ) y vitrificación.(64,5%)	No descrito.	No descrito.
Sanfilippo y cols (2015) (7)	No descrito.	Resultados comparables; 83,6% de folículos intactos luego de vitrificación, 80,7% para congelación lenta.	Morfología preservada.	Sin diferencias significativas entre grupos de criopreservación ( $p>0,05$ ), y entre estos y el tejido fresco (vitrificación 20,8%, congelación

				lenta 31,3%, tejido fresco 35%), analizando el sector estromal y folicular.
Fabbri y cols (2016) (4)	Ausencia de apoptosis; : altos niveles de proteína antiapoptótica bcl2, no tinción positiva para TUNEL. Alta capacidad de proliferación por tinción positiva para ki67.	Morfología bien preservada, presencia de folículos primordiales sobre todo, y folículos secundarios, primarios y preantrales.	Arquitectura intacta de células estromales, no vacuolización, cromatina dispersa.	No descrito.
Fabbri y cols (2016) (15)	Actividad mitocondrial y niveles de especies reactivas de oxígeno reducidos en congelación lenta y vitrificación. Mayor descenso en sector interno que externo en muestras vitrificadas.	Núcleos de ovocitos con engrosamiento de cromatina y formas irregulares en tejido vitrificado. Leve crio-daño para ambas técnicas.	Similar a tejido fresco, pero se observó leve edema intersticial y daño celular en congelación lenta.	No descrito.
Wang y cols (2016) (16)	Sin diferencias en cantidad de folículos con alta viabilidad para tejido fresco (62,5%), congelación lenta (44%) y vitrificación (41,7%) por tinción con calceína.	Sin diferencias entre las técnicas para folículos intactos, y morfología y diámetro folicular entre ambas técnicas. Sí diferencia con tejido fresco.	No descrito.	No descrito.
Quingquan Shi y cols (2017) (17)	No descrito.	Sin diferencias en proporción de folículos intactos entre congelación lenta y vitrificación.	Sin diferencias en células estromales.	Menor daño de ADN en tejido vitrificado.
Dalman y cols (2017) (18)	Mayor expresión de genes apoptóticos (p53, BAX, CASP9) en vitrificación. En congelación lenta mayores niveles de gen antiapoptótico BCL2 y expresión de	Sin diferencias en estatus folicular, 97,4% folículos intactos en congelación lenta y 91,4% en vitrificación.	El compartimento estromal mantuvo sus características.	No descrito.

	vía WNT (estimula proliferación).			
Xiao y cols (2017) (11)	Mayor número de células apoptóticas en sistema con vial de plástico.	Porcentaje de folículos primordiales de morfología normal menor en sistema cerrado de plástico en comparación con sistema de plata cerrado. No diferencias entre sistema abierto y cerrado de plata.	No descrito.	No descrito.
Almodin y cols (2020) (12)	No descrito.	No hay diferencias significativas entre tejido fresco y vitrificado.	Leve edema, fragmentación citoplasmática y eosinofilia. No necrosis.	No descrito.
Kometas y cols (2021) (19)	Resultados variados según método. Sin diferencias al utilizar calceína. Menor actividad mitocondrial en tejido vitrificado.	No hay diferencias significativas en distribución y morfología folicular.	No descrito.	Tres estudios no mostraron diferencias. Uno demostró mayor fragmentación en tejido vitrificado y dos en congelación lenta.
Sugishita y cols (2021) (21)	No se encontraron diferencias en los porcentajes de folículos primarios o primordiales positivos entre los tres métodos de criopreservación.	Las diferencias de densidad de folículos en los diferentes métodos de criopreservación (Slow freezing, vitrificación con sistema cerrado y abierto) no fueron significativas.	No descrito.	Analizando los resultados en los tres métodos de criopreservación no se encontraron diferencias significativas en daños a la integridad del ADN.
Galbinski y cols (2022) (24)	Mejor respuesta al estrés térmico en grupo de congelación lenta, por medición de HSP70 tras exposición del tejido a 42º.	Disminución en número total de folículos intactos en 2 grupos de criopreservación, mayor en congelación lenta ( $p=0,004$ ).	No descrito.	No descrito.
	Altas tasas de supervivencia folicular en ambos	No descrito.	No descrito.	No descrito.

Schallmoser y cols (2022) (22)	grupos por tinción con calceína (68,8 folículos por muestra de congelación lenta, 59,8 en vitrificación).			
Behl y cols (2023) (26)	No descrito.	Sin diferencias según 9 trabajos, dos refieren mayor proporción de folículos intactos en vitrificación y uno en congelación lenta.	Dos estudios refieren mayor cantidad de células estromales intactas en vitrificación, y otros dos no muestran diferencias.	Tres trabajos refieren menor fragmentación en vitrificación, dos estudios para congelación lenta y otros tres no refieren diferencias.
Schallmoser y cols (2023) (25)	Viabilidad preservada, determinada por tinción positiva de PCNA.	Integridad celular conservada.	No descrito.	Fragmentación no significativa en ambas técnicas.

### Resultados post reimplante de tejido ovárico (Tabla 3):

Cinco estudios describen el restablecimiento de la función hormonal y las tasas de embarazo en mujeres que reimplantaron el tejido ovárico criopreservado. En el segundo estudio de Silber y cols. (21) se agregan nuevos resultados a los ya reportados en 2018 (2), por lo tanto se toman en cuenta los más recientes para el conteo de casos totales.

Todos los estudios describen resultados exitosos luego del reimplante de tejido preservado mediante congelación lenta (2,4,11,15), pero solamente Silber y cols. (18) incluyen casos de reimplante de tejido ovárico post vitrificación. En cuatro trabajos se describieron 101 casos de reimplante, siendo 97 auto trasplantes ortotópicos (2,4,11,21) y cuatro heterotópicos (11). La función hormonal se recuperó entre los 4 y 5 meses posteriores al reimplante (2,4,15), en base a la normalización de los niveles de FSH, LH y recuperación de los ciclos menstruales.

En la revisión publicada por Khattak y cols. (15) no se informa la cantidad de trasplantes por sitio de implantación, ni la edad de las pacientes al momento del reimplante del tejido.

De los 101 auto trasplantes realizados que se describen en los estudios experimentales (2,4,11) se lograron 46 embarazos (6 con técnicas de fertilización asistida y 40 embarazos espontáneos) y el nacimiento de 32 nacidos vivos

**TABLA 3****Resultados post reimplante**

<b>Autor</b>	<b>Número de pacientes con reimplante</b>	<b>Edad al momento del reimplante</b>	<b>Sitio de reimplante</b>	<b>Función hormonal</b>	<b>Número de embarazos</b>	<b>Nacidos vivos</b>
Donnez Dolmans (2013) (4)	60	No especifica	Trasplante ortotópico	52 mujeres recuperaron la función ovárica, con una media de 4,5 meses	18	12
Silber (2018) (2)	13	25 - 39 (31)	Trasplante ortotópico	Todas consiguieron menstruaciones regulares y niveles adecuados de FSH a los 4-5 meses.	9	11 con congelación lenta 2 con vitrificación
Silber (2021) (21)	17	18 - 31 (24)	Trasplante ortotópico	Se recuperaron menstruaciones regulares y niveles adecuados de FSH a los 4-5 meses.	22	16 con congelación lenta 3 con vitrificación
Fabbri (2022) (22)	24 pacientes 33 reimplantes	36,24 trasplante ortotópico 33,75 heterotópico	4 trasplante heterotópico 20 ortotópico	15 recuperaron sus ciclos menstruales.	6	4
Khattak (2022) (15)	547	No especifica	Ortotópico y heterotópico (no especifica n)	196 mujeres recuperaron sus ciclos a las 18,5 semanas, tiempo que coincide con la normalización de niveles de FSH, LH y estrógeno.	260	166

## DISCUSIÓN

Este trabajo analiza los resultados de las técnicas más utilizadas para la criopreservación de tejido ovárico, haciendo énfasis en su efectividad para preservar la viabilidad y la función tisular en vistas de poder ser reimplantado y preservar la función ovárica normal.

En la mayoría de los trabajos experimentales incluidos en esta revisión se estudia un número de pacientes menor a 100; lo que podría sugerir baja representatividad de la población general. Sin embargo, al ser un procedimiento poco frecuente es esperable que la muestra sea de tamaño reducido, y al analizar los resultados en conjunto se observaron hallazgos consistentes.

En la mayoría de los estudios, el tejido ovárico extraído de cada paciente se preserva tanto por método de congelación lenta como por vitrificación. Al comparar ambas técnicas sobre un mismo tejido podemos comparar de manera específica los resultados de las técnicas entre sí, evitando probables sesgos causados por otras variables como edad, patología de base etc.

Los autores destacan que los protocolos de congelación lenta se encuentran estandarizados debido a su uso frecuente en protocolos experimentales y en aplicación clínica (16,20,25), mientras que respecto a la vitrificación es necesario definir con mayor precisión los protocolos a utilizar. No obstante, observamos diferencias en los protocolos en ambas técnicas, en términos de edad, tipo de patologías, técnica de resección y grosor del tejido. Por lo tanto, se puede inferir que tampoco se encuentra totalmente estandarizado el protocolo de congelación lenta.

Las características histológicas y funcionales del tejido ovárico están condicionadas por la edad, esto debe ser considerado a la hora del análisis del tejido criopreservado. Dado que se incluyeron pacientes de un rango de edad muy amplio, el tejido analizado puede pertenecer a pacientes premenopáusicas hasta niñas que no alcanzaron la menarca. No sólo las características del tejido sino incluso el tipo de respuesta alcanzado.

Respecto a la técnica de resección del tejido no se encontró una asociación entre esta y la técnica de criopreservación utilizada, aunque sí se destaca una tendencia a realizar la ooforectomías parciales sobre la total desde el año 2021 sobre todo en la población adulta. En el caso de niñas dado que el ovario tiene un tamaño pequeño habitualmente se realiza ooforectomía unilateral. El grosor del tejido extraído es variable en todos los estudios, aspecto que también indica la variabilidad en los protocolos utilizados en los diferentes trabajos.

En los trabajos revisados se usan distintas combinaciones de crioprotectores para reducir la toxicidad de las sustancias individuales, como el DMSO, etilenglicol, propilenglicol, así como el tiempo de exposición a las mismas, que varía entre 15 y 60 minutos. Como la vitrificación es una técnica de enfriamiento rápido reduce la formación de cristales de hielo en el tejido, pero hace necesaria la utilización de mayores cantidades de crioprotectores, que puede llegar a ser tóxico para las células vivas (14,25).

La morfología folicular se ve levemente alterada en las muestras de tejido vitrificado en el estudio de Fabbri y cols. (17), daño que los autores atribuyen al mayor tamaño en esas muestras en comparación con las de congelación lenta. Los autores sugieren que las soluciones utilizadas podrían no penetrar el tejido de forma adecuada y no protegerlo del crio-daño. Además, al no existir dispositivos certificados para realizar vitrificación los autores utilizaron un soporte de plástico para criopreservar las muestras. Dado que el plástico es un no adecuado conductor de temperatura, se considera que podría causar un descenso inadecuado de la misma, y por consiguiente mayor daño tisular.

Los tiempos entre criopreservación y trasplante son variables de acuerdo a cada caso y trabajo analizado, y pueden ser muy prolongados en pacientes que lo almacenan en la niñez, sin ser una limitante en la calidad del tejido. Como se evidencia en el estudio de Fabbri y cols. (11), la criopreservación de tejido por 18 años no afecta la morfología tisular o su potencial de desarrollo.

El cultivo de los tejidos o el trasplante de tejido entre especies filogenéticamente diferentes (xenotrasplante)(26), pueden demostrar la supervivencia de los folículos criopreservados y su potencial de desarrollo (17), pero la calidad real del tejido sólo se puede evidenciar luego de trasplantar el tejido nuevamente en la paciente.

Se reportaron solamente tres embarazos con tejido criopreservado por vitrificación, en el estudio de Silber y cols. (21). quien comenzó a implementar la técnica en 2007 luego de varios años de usar la congelación lenta. Aunque sean los únicos embarazos reportados con vitrificación por el momento, son resultados prometedores que demuestran la eficacia de la vitrificación como técnica y estimulan a continuar con su utilización, para idealmente implementarla a gran escala.

Una limitante planteada en algunos de los trabajos revisados es el riesgo de reimplantar células tumorales al momento del autotrasplante. Si bien hay quienes manifiestan que con la tecnología disponible actualmente no debería existir dicho riesgo; se recomienda un exhaustivo análisis del tejido previo al re-implante para descartar la presencia de células tumorales. No debe perderse de vista este riesgo ya que puede comprometer el pronóstico de

las pacientes. En la literatura científica se describe solamente un caso de recurrencia de la enfermedad luego del autotrasplante, en una paciente con diagnóstico de sarcoma de Ewing (22). Como no es claro si la recurrencia es causada por una metástasis ovárica, no se puede determinar una clara asociación entre el re implante del tejido ovárico y la recaída.

Si bien la congelación lenta es la técnica más difundida y aplicada, requiere un equipamiento especial, costoso, y tiempos de procesamiento prolongados. Debe ser realizado por personal altamente capacitado, que contribuye al gran costo del procedimiento. En contraposición, la vitrificación es una técnica de menor complejidad, costo y no requiere extensa formación del personal que la realiza , volviéndola una técnica más accesible (24).

## **CONCLUSIÓN**

Durante esta revisión de la literatura se realizó un análisis comparativo de las publicaciones disponibles en cuanto a la aplicación de técnicas de criopreservación de tejido ovárico. Se destaca que la vitrificación no ha demostrado ser inferior en cuanto a su eficacia en comparación con los protocolos de congelación lenta, obteniendo resultados comparables. Otro punto a destacar es la gran variabilidad que existe en los protocolos de procesamiento utilizados tanto para congelación lenta como para la vitrificación, aspecto importante a la hora de plantear la introducción de esta última como técnica de referencia en nuestro medio.

Además, se identifica la necesidad de realizar un seguimiento a largo plazo de los resultados del trasplante, respecto a niveles hormonales y resultados obstétricos, otorgando mayor valor a la técnica.

Con base al estudio de las variables encontradas en esta revisión y como forma de avanzar en la situación en la que se encuentra nuestro país, diseñamos un cuestionario modelo que permita: a) caracterizar la población uruguaya en la que se ha realizado criopreservación de tejido ovárico (2004 - 2022), y b) crear una base de datos que posibilite la evaluación del protocolo actual y de ser necesario considerar la actualización del mismo. El cuestionario modelo se adjunta en anexos.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la Facultad de Medicina, a la Clínica Ginecológica B, y los departamentos de Histología y Embriología, Bioética, Métodos Cuantitativos y Medicina Preventiva. Agradecemos a nuestras tutoras Dra. Dana Kimelman y Dra. Rebeca Chávez por su valioso apoyo y orientación a lo largo de este trabajo. Su experiencia, conocimiento y dedicación fueron fundamentales para el éxito de nuestro proyecto.

## REFERENCIAS

1. Conversación sobre oncofertilidad con la doctora Teresa Woodruff - NCI [Internet]. 2020 [citado 14 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2020/oncofertilidad-woodruff>
2. Silber SJ, DeRosa M, Goldsmith S, Fan Y, Castleman L, Melnick J. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA. *J Assist Reprod Genet.* 1 de diciembre de 2018;35(12):2205-13.
3. Harada M, Osuga Y. Fertility preservation for female cancer patients. *Int J Clin Oncol.* enero de 2019;24(1):28-33.
4. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Serrano MS, Schmidt KT, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril.* 1 de mayo de 2013;99(6):1503-13.
5. Marin L, Bedoschi G, Kawahara T, Oktay KH. History, Evolution and Current State of Ovarian Tissue Auto-Transplantation with Cryopreserved Tissue: a Successful Translational Research Journey from 1999 to 2020. *Reprod Sci.* 6 de enero de 2020;27(4):955-62.
6. Behl S, Joshi VB, Larson NB, Young MC, Bilal M, Walker DL, et al. Vitrification versus slow freezing of human ovarian tissue: a systematic review and meta-analysis of histological outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 1 de marzo de 2023;40(3):455-64.
7. Sanfilippo S, Canis M, Smitz J, Sion B, Darcha C, Janny L, et al. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reprod Biol Endocrinol.* 25 de junio de 2015;13(1):67.
8. Sugishita Y, Taylan E, Kawahara T, Shahmurzada B, Suzuki N, Oktay K. Comparison of open and a novel closed vitrification system with slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation. *J Assist Reprod Genet.* 1 de octubre de 2021;38(10):2723-33.
9. Sanada Y, Harada M, Kunitomi C, Kanatani M, Izumi G, Hirata T, et al. A Japanese nationwide survey on the cryopreservation of embryos, oocytes and ovarian tissue for cancer patients. *J Obstet Gynaecol Res.* 2019;45(10):2021-8.
10. Galbinski S, Kowalewski LS, Grigolo GB, da Silva LR, Jiménez MF, Krause M, et al. Comparison between two cryopreservation techniques of human ovarian cortex: morphological aspects and the heat shock response (HSR). *Cell Stress Chaperones.* 1 de marzo de 2022;27(2):97-106.
11. Fabbri R, Macciocca M, Vicenti R, Pasquinelli G, Caprara G, Valente S, et al. Long-term

- storage does not impact the quality of cryopreserved human ovarian tissue. *J Ovarian Res.* 24 de agosto de 2016;9(1):50.
12. El Cury-Silva T, Nunes MEG, Casalechi M, Comim FV, Rodrigues JK, Reis FM. Cryoprotectant agents for ovarian tissue vitrification: Systematic review. *Cryobiology.* 1 de diciembre de 2021;103:7-14.
  13. Xiao Z, Zhang Y, Fan W. Cryopreservation of human ovarian tissue using the silver closed vitrification system. *J Assist Reprod Genet.* 1 de noviembre de 2017;34(11):1435-44.
  14. Almodin CG, Radaelli MR, Almodin PM, Mingetti-Câmara VC, Silva CG da. Vitrification technique for female germinative tissue cryopreservation and banking. *JBRA Assist Reprod.* 1 de mayo de 2020;24(2):128-34.
  15. Khattak H, Malhas R, Craciunas L, Afifi Y, Amorim CA, Fishel S, et al. Fresh and cryopreserved ovarian tissue transplantation for preserving reproductive and endocrine function: a systematic review and individual patient data meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 1 de junio de 2022;28(3):400-16.
  16. Klocke S, Bündgen N, Köster F, Eichenlaub-Ritter U, Griesinger G. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Arch Gynecol Obstet.* 1 de febrero de 2015;291(2):419-26.
  17. Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, Martino NA, Dell'Aquila ME, Pasquinelli G, et al. Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. *Hum Reprod.* 1 de agosto de 2016;31(8):1838-49.
  18. Wang T ren, Yan J, Lu C ling, Xia X, Yin T lang, Zhi X, et al. Human single follicle growth in vitro from cryopreserved ovarian tissue after slow freezing or vitrification. *Hum Reprod Oxf Engl.* abril de 2016;31(4):763-73.
  19. Dalman A, Deheshkar Gooneh Farahani NS, Totonchi M, Pirjani R, Ebrahimi B, Rezazadeh Valojerdi M. Slow freezing versus vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation: An evaluation of histological changes, WNT signaling pathway and apoptotic genes expression. *Cryobiology.* diciembre de 2017;79:29-36.
  20. Kometas M, Christman GM, Kramer J, Rhoton-Vlasak A. Methods of Ovarian Tissue Cryopreservation: Is Vitrification Superior to Slow Freezing?—Ovarian Tissue Freezing Methods. *Reprod Sci.* 1 de diciembre de 2021;28(12):3291-302.
  21. Silber SJ, Goldsmith S, Castleman L, Hurlbut K, Fan Y, Melnick J, et al. In-vitro maturation and transplantation of cryopreserved ovary tissue: understanding ovarian longevity. *Reprod Biomed Online.* 1 de marzo de 2022;44(3):504-14.
  22. Fabbri R, Vicenti R, Magnani V, Paradisi R, Lima M, De Meis L, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: 20 years experience in Bologna University. *Front Endocrinol [Internet].* 2022 [citado 14 de noviembre de 2023];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.1035109>
  23. Schallmoser A, Einenkel R, Färber C, Hüren V, Emrich N, John J, et al. Comparison of angiogenic potential in vitrified vs. slow frozen human ovarian tissue. *Sci Rep.* 9 de agosto de 2023;13(1):12885.
  24. Schallmoser A, Einenkel R, Färber C, Emrich N, John J, Sängner N. The effect of high-throughput vitrification of human ovarian cortex tissue on follicular viability: a promising alternative to conventional slow freezing? *Arch Gynecol Obstet.* 1 de febrero de 2023;307(2):591-9.
  25. Shi Q, Xie Y, Wang Y, Li S. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-anlaysis. *Sci Rep.* 17 de agosto de 2017;7(1):8538.
  26. Aristizabal AM, Caicedo LA, Martínez JM, Moreno M, Echeverri GJ. Xenotrasplantes, una realidad cercana en la práctica clínica: revisión de la literatura. *Cir Esp.* 1 de febrero de 2017;95(2):62-72.

## **ANEXOS**

### **Formulario de entrevista**

#### **Características demográficas**

¿Cuál es su fecha de nacimiento?

¿Cuál es su procedencia?

- a. Montevideo
- b. Interior

¿Cuál es su máximo nivel educativo alcanzado?

- a. Primario incompleto
- b. Primario completo
- c. Secundario incompleto
- d. Secundario completo
- e. Terciario incompleto
- f. Terciario completo

¿Cuál es su estado civil actual?

- a. Soltera
- b. Casada
- c. Viuda
- d. Divorciada

¿Cuál es su prestador de salud?

- a. ASSE
- b. Mutualista
- c. Seguro Privado

#### **Antecedentes Personales**

##### **Al momento de criopreservar su tejido ovárico:**

¿Tenía alguna enfermedad (sin contar la patología oncológica)?

- a. DM
- b. HTA
- c. Hipotiroidismo
- d. Otras
- e. Ninguna

¿Tenía/tuvo alguna de las siguientes enfermedades de transmisión sexual?

- a. VIH
- b. Sífilis
- c. Hepatitis
- d. Otras
- e. Ninguna

Respecto a su patología oncológica:

¿Qué tipo de cáncer tuvo?

¿Cuál fue la fecha de diagnóstico?

¿En qué estadio se diagnosticó?

¿Qué tratamiento oncológico recibió?

- a. Quimioterapia

- b. Radioterapia
- c. Cirugía
- d. Combinado

### **Antecedentes Gineco-Obstétricos**

¿A qué edad tuvo su primera menstruación?

¿Tenía ciclos regulares?

¿Tuvo alguna de las siguientes patologías ginecológicas?

- a. Endometriosis
- b. Ovario poliquístico
- c. Miomatosis uterina
- d. Ninguna

¿Tuvo embarazos previos a su patología oncológica?

- a. Sí
- b. No

¿Padece patología obstétrica?

- a. Ninguna
- b. Estados Hipertensivos del Embarazo
- c. DM gestacional
- d. Amenaza de Parto Pretérmino
- e. Rotura Prematura de Membranas
- f. Otra

¿Alcanzó la menopausia luego del tratamiento oncológico?

- a. Sí
- b. No

### **Criopreservación**

¿Por qué motivo decidió criopreservar?

- a. Deseo concepcional insatisfecho
- b. Prevención de falla ovárica prematura
- c. Única opción disponible para preservar la fertilidad

¿En qué año realizó la criopreservación de tejido ovárico?

¿Qué conducta se tomó respecto al otro ovario?

- a. Trasplante heterotópico
- b. Se mantuvo en abdomen
- c. Se removió
- d. Desconoce

¿Tuvo complicaciones como sangrados, infección o hematomas después de la cirugía?

- a. Sí
- b. No

### **Reimplantación**

¿Realizó reimplantación del tejido preservado?

- a. Sí
- b. No

**En caso que sí:**

¿En qué año se reimplantó?

¿Recuperó sus ciclos menstruales?

- a. Sí
- b. No

¿Logró un embarazo espontáneo?

- a. Sí
- b. No

¿Cuántos?

¿Lo logró con técnicas de fertilización asistida?

- a. Sí
- b. No

¿Cuántos?

¿Padeció patología obstétrica?

- a. Ninguna
- b. Estados Hipertensivos del Embarazo
- c. DM gestacional
- d. Amenaza de Parto Pretérmino
- e. Rotura Prematura de Membranas
- f. Otra

¿Cuántos bebés nacieron vivos?

¿Tuvo óbitos o abortos espontáneos? Sí / NO / Cuántos

¿Tuvo una recidiva de su enfermedad oncológica luego de la reimplantación?

- a. Sí
- b. No

¿Tuvo falla ovárica prematura?

- a. Sí
- b. No

**En caso que no haya realizado reimplantación:**

¿Por qué motivo no lo realizó?

- a. No tiene deseo concepcional
- b. No se lo permite su patología oncológica
- c. Aún no tuvo oportunidad
- d. Otras