

Vitrificación en *cryotop*: un método altamente eficaz para la criopreservación de ovocitos humanos

*Vitrification in cryotop is a higher efficient technique
for the criopreservation of human oocytes*

García-Amador MI,¹ Chávez-Badiola A,¹ Medina-Flores J,¹ Montoya-Sarmiento JE,² Quiroz-Torres E,¹ Martínez-Armas R,¹ Ruvalcaba-Castellón LA.¹

► RESUMEN

Objetivo: Dar a conocer la evolución de 1319 ovocitos humanos vitrificados en un centro de reproducción asistida en Guadalajara, México.

Material y métodos: Se vitrificaron los ovocitos excedentes de 79 pacientes en 88 ciclos de fecundación *in vitro* y 123 ciclos de donantes de julio del 2004 a diciembre del 2008. Se realizó una estimulación ovárica con FSHr o menotropinas, de acuerdo con la conveniencia clínica y la GnRh antagonista. Se aspiraron los ovocitos 36 h después de la administración de 10,000 UI de hCG. Los ovocitos maduros se colocaron en un plato de cultivo con una gota de 30 µl de solución de lavado y dos de solución de equilibrio (etilenglicol al 7.5% y dimetilsulfóxido [DMSO] al 7.5%) y se crearon puentes entre ellas cada dos a tres minutos. Luego se depositaron en la solución de vitrificación (etilenglicol al 15%, DMSO al 15% y sucrosa, 0.5 M). De ésta, se aspiraron y depositaron en la superficie del *cryotop* y éste se sumergió directamente en un recipiente con nitrógeno líquido para la colocación de su cubierta protectora. Se efectuó la

► ABSTRACT

Objective: Describe the evolution of 1319 human oocytes vitrified in *cryotop* of an assisted reproduction centre in Guadalajara, México.

Material and methods: In instance was vitrified the oocytes excessive of the cycle in fresh of 79 patients summated in vitro fertilization cycle and 123 donation cycles of July 2004 to December 2008. The oocytes were separated of the cumulus and submerged in a balanced solution (ethylene glycol 7.5% y dimethyl sulphoxide –DMSO 7.5%) 10 minutes, afterwards were deposited in a composed vitrification solution of (ethylene glycol 15%, DMSO 15% and sucrose 0.5M) in which case were aspirated to be deposit in the *cryotop* and then submerged directly in a depository with liquid nitrogen, so it can be covered protected. Afterwards, they were thawed by a thaw solution and washed in two fazes (WS-1 y WS-2) (Kit-Kitazato-Japan). The survivor oocytes were microinjected (ICSI). The embryos were transferred in day 2 under ecographic guide.

Results: Were thawed 1319 oocytes with 90.2% survival (Table 1). We transfer embryos in day two of development to 199 patients in 257 cycles (Table 2). We succeed 73 pregnancies

¹Instituto Mexicano de Infertilidad (IMI). Guadalajara, Jalisco, México.

²Instituto Mexicano de Infertilidad-Mazatlán. México.

Correspondencia: Dra. Martha Isolina García Amador. Boulevard Puerta de Hierro 5150. Torre C, 503-506. Col. Plaza Corporativa Zapopan. C.P. 45116. Guadalajara, Jalisco. México. Teléfono: (01) 333648-2550. Correo electrónico: mgarciaamador@yahoo.com

descongelación 48 h antes de la transferencia embrionaria con solución descongelante y lavado (WS-1 y WS-2) (Kit-Kitazato-Japón). Los ovocitos sobrevivientes se microinyectaron (ICSI). Los embriones se transfirieron el segundo día de desarrollo bajo guía ecográfica.

Resultados: Se han descongelado 1319 ovocitos con una supervivencia del 90.2%. Se transfirieron embriones en el segundo día de desarrollo en 199 pacientes en 257 ciclos. Se han conseguido 73 embarazos (36.6%) y han nacido 65 neonatos saludables.

Conclusión: La vitrificación en *cryotop* es una técnica altamente eficaz para la criopreservación de ovocitos humanos.

Palabras claves: vitrificación, ovocitos, congelación, Guadalajara, México.

(36.6%). The proportion of pregnancies per cycle is 28.4%. At the moment 65 babies have been born.

Conclusion: Vitrification is a higher efficient technique for the cryopreservation of human oocytes.

Key words: vitrification, cryopreservation, freezing, cryotop, Guadalajara, Mexico.

► INTRODUCCIÓN

En 1986¹ se informó el primer embarazo a partir de un ovocito criopreservado mediante congelación lenta y con dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector. Sin embargo, con el tiempo, la técnica de congelación lenta convencional ofreció bajas tasas de supervivencia ovocitaria y embarazo,²⁻⁵ lo cual dio origen a la realización de múltiples ensayos y a la modificación del tipo de crioprotector utilizado, el volumen o sus concentraciones,⁶⁻¹⁰ el objetivo era alcanzar resultados verdaderamente alentadores.

La idea de vitrificar, o alcanzar un estado similar al vidrio, se describió por primera vez en 1860 y la retomó Luyet en 1937. Cincuenta años más tarde (1985), Rall y Fahy¹¹ describieron como una alternativa potencial la congelación lenta, que consiste en solidificar una solución por enfriamiento rápido, hasta formar un estado vídrio por elevación extrema de su viscosidad. Trounson¹² fue el primero en sumergir un ovocito directamente en nitrógeno líquido y notificó una supervivencia aceptable y fecundación, pero bajas tasas de clivaje para la vitrificación.

Los procedimientos actuales de vitrificación implican la exposición de la célula a un volumen reducido de crioprotectores a elevadas concentraciones, seguido de congelación rápida en nitrógeno líquido. La alta osmolaridad de la solución de vitrificación rápidamente deshidrata a la célula. Al sumergirla de forma súbita en nitrógeno líquido se solidifica, de tal manera que el

agua intracelular no tiene tiempo para formar cristales y lesionar a los organelos intracelulares;¹³ esto incrementa su supervivencia.

Varios autores han referido otros daños atribuibles a la célula, consecutivos a las bajas temperaturas; uno de los más importantes es la alteración de la segregación de los cromosomas durante la meiosis II.¹⁴⁻¹⁶ A ese respecto, la evidencia es aún insuficiente y un tanto controversial, ya que de igual manera otros sugieren que el huso meiótico puede sobrevivir a procesos de congelación-descongelación sin consecuencias, o al menos sin incremento del número de aneuploidías en los embriones resultantes.¹⁷⁻²⁰

Un programa efectivo de criopreservación de ovocitos resulta de gran utilidad para mujeres que, por razones médicas o personales, necesitan diferir la posibilidad de embarazarse, ya sea por amenaza de pérdida de la función ovárica, afección oncológica que exige quimioterapia o radioterapia o restricciones éticas y religiosas que limiten la criopreservación de embriones. Entre sus beneficios pueden mencionarse la posibilidad de preservar los ovocitos excedentes de ciclos de hiperestimulación en técnicas de reproducción asistida y facilitar a los centros de reproducción la posibilidad de crear un banco de óvulos eficiente.

A pesar de los beneficios reconocidos de la técnica de vitrificación, los datos informados aún son insuficientes.²¹ Este estudio tiene por objetivo dar a conocer la evolución de más de 1000 ovocitos humanos vitrificados en *cryotop* en un centro de reproducción asistida.

▷ MATERIAL Y MÉTODOS

Éste es un estudio descriptivo y observacional realizado en el Instituto Mexicano de Infertilidad de Guadalajara entre julio de 2004 y diciembre de 2008. Se vitrificaron los ovocitos propios excedentes de 79 pacientes en 88 ciclos de hiperestimulación ovárica para fecundación *in vitro* y 169 ciclos de donantes.

Hiperestimulación ovárica. La estimulación del ovario se realizó con hormonas recombinantes (FSHr) o menotropinas, de forma inicial en los días segundo o tercero del ciclo menstrual, de acuerdo con cada caso. Se aplicó el antagonista del GnRh (GnRH) cuando al menos dos folículos alcanzaron 14 mm de diámetro. Se administraron hCG (10,000 UI) cuando dos o más folículos alcanzaron los 18 mm de diámetro. Los ovocitos se aspiraron 36 h después y se colocaron en medio de cultivo *Upgraded B2 INRA* (CCD) previamente gasificado (durante 18 h en promedio a 37°C y 5% de CO₂). En éste permanecieron un promedio de dos horas y luego se separaron del cúmulo. Se identificaron los ovocitos en metafase II por la extrusión del primer cuerpo polar y se vitrificaron.

Técnica de vitrificación. Una vez separados del cúmulo, los ovocitos en metafase II se depositaron en la primera gota de un plato de cultivo con tres gotas de solución de 30 µl cada una. La primera era de solución de lavado y las otras de solución de equilibrio (etilenglicol al 7.5% y dimetilsulfóxido al 7.5%), hasta crear puentes entre ellas con la pipeta Pasteur, en dos ocasiones cada tres minutos hasta completar un promedio de 10 minutos. A continuación se depositaron en la solución de vitrificación (etilenglicol al 15%, dimetilsulfóxido al 15% y sucrosa, 0.5 M). En ésta se aspiraron, se devolvieron tres o cuatro veces y depositaron sobre la superficie del *cryotop* (Kitazato Supply Co, Fujinomiya, Japan).

El *cryotop* consiste en una lámina muy delgada de polipropileno de 0.4 mm de ancho por 20 mm de largo x 0.1 mm de espesor y una cubierta protectora, también plástica de 3 cm de longitud (**Imagen 1**). El *cryotop* se sumergió de manera súbita y directa en un recipiente con nitrógeno líquido para la colocación de su cubierta protectora (**Imagen 2**). Los dos últimos pasos deben realizarse en el lapso de un minuto.

Descongelación. Para esta fase se observaron los siguientes pasos:

1. Los ovocitos se depositaron en solución descongelante por un minuto.
2. Luego se aplicó una solución diluyente por tres minutos.

Imagen
Cryotop.

1.

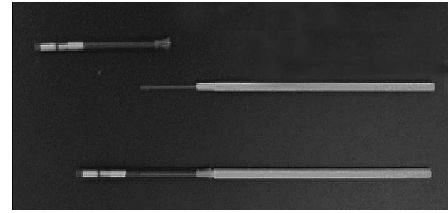


Imagen 2.

Cryotop sumergido directamente en nitrógeno líquido.



3. De ésta se trasladaron a la primera solución de lavado (5 min) y luego a la segunda (5 min).
4. Los ovocitos sobrevivientes se dejaron en medio de cultivo por dos a cuatro horas y posteriormente se microinyectaron mediante la técnica convencional de ICSI.

Las soluciones utilizadas son de Kitazato Supply Co., Japón.

Transferencia embrionaria. En todas las pacientes los embriones se transfirieron el segundo día del desarrollo, bajo guía ecográfica con equipo de ultrasonido marca Aloka SSD500. Para la preparación endometrial se usó agonista del GnRH en las mujeres con función ovárica y estradiol en dosis progresivas, al principio con 2 mg los primeros ocho días del ciclo de preparación, 2 mg cada 12 h los días noveno, décimo y undécimo y 2 mg cada ocho horas a partir del día duodécimo. Para el soporte lúteo se inició progesterona en perlas de 200 mg el día de la descongelación de los ovocitos en horas de la tarde y se mantuvo cada 12 h hasta el día de la transferencia de los embriones. En este último día se incrementó la dosis a 200 mg oral cada ocho horas, y se agregó progesterona en ampollas de 50 mg, una dosis diaria por vía intramuscular. En promedio, estrógeno y progesterona se mantuvieron hasta la semana octava de gestación.

Tabla 1.

Evolución de los ovocitos vitrificados de acuerdo con su origen.

Ovocitos	Desvitrificados n (%)	Sobreviven n (%)	Se fecundan n (%)	Se dividen n (%)
Propios	460 (35)	411 (89.3)	358 (87.1)	324 (90.5)
Donados	859 (65)	779 (90.6)	711 (91.2)	648 (91.1)
Total	1319 (100)	1190 (90.2)	1069 (89.8)	972 (90.9)

Instituto Mexicano de Infertilidad (IMI), 2004-2008.

Tabla 2.

Generalidades y proporción de embarazos en pacientes con transferencia de embriones a partir de ovocitos vitrificados.

Origen de los ovocitos	Propios n (%)	Donados n (%)	Global n (%)
Número de ciclos	88 (34.2)	169 (65.8)	257
Número de pacientes	79 (39.7)	120 (60.3)	199
Edad promedio	34 ± 3.8	40 ± 5.3	37.9 ± 5
Tiempo implant/emb transf.	324/18 (18)	648/72 (9)	10.8
Embriones transferidos	324 (33.3)	648 (66.7)	972
Embriones/ciclo	18/88 (20.4)	55/169 (32.5)	73/257 (28.4)
Embriones/paciente	18/79 (22.7)	55/120 (45.8)	73/199(36.6)
Abortos	—	13 (17.8) ^a	13 (17.8) ^a
Embriones bqcos.	—	3	3

Instituto Mexicano de Infertilidad (IMI), 2004-2008.

^a Un embarazo ectópico cornual.

Análisis de los datos. Se emplearon la estadística descriptiva, cuadros de frecuencia y porcentaje, medidas de tendencia central y dispersión.

► RESULTADOS

Se desvitrificaron 1319 ovocitos entre julio del 2004 y diciembre del 2008 con una supervivencia del 90.2% (1190). Hasta 65% de los óvulos descongelados pertenecía a ovodonadoras. Se consiguió la fecundación después de la microinyección por ICSI en el 90%. De esa proporción, el 91% se dividió a cuatro células en el segundo día de desarrollo (**Tabla 1**).

La edad promedio de las pacientes transferidas fue de 34 ± 3.8 años (ovocitos propios) y 40 ± 5.3 años (ovocitos donados). Se han logrado 73 embarazos en 199 pacientes (36.6%), 18 de ellas en el grupo de ovocitos propios y 55/120 en el grupo de ovocitos donados. Trece embarazos (17.8%) no llegaron al término, uno de ellos un embarazo ectópico cornual (**Tabla 2**).

Han nacido 65 neonatos, producto de 36 gestaciones únicas, 10 gemelares dobles y dos triples. Entre los nacidos, conviene destacar el caso de una paciente nacida de la combinación de técnicas de maduración *in vitro* de ovocitos humanos (MIV) y vitrificación. Los ovocitos madurados *in vitro* y descongelados se transfirieron también en el segundo día de desarrollo embrionario en un ciclo posterior de preparación endometrial. Los nacidos vivos han sido sanos con excepción de una niña, hija de madre diabética en la que se diagnosticó una comunicación interventricular (**Tabla 3**).

► DISCUSIÓN

La vitrificación conjuga altas concentraciones de crioprotectores en un volumen mínimo y elevadas velocidades de congelación (15,000-30,000 °C/min),²² lo que genera como consecuencia la ausencia de cristales de hielo durante los procesos de congelación-descongelación,²³ una mejor conservación de la ultraestructura y

Tabla 3.

Nacidos vivos de acuerdo con el origen de los ovocitos.

	Propios	Donados	Total
Nacidos vivos	17*	48	65*
Gestaciones únicas	17	22	39
Gemelares	—	10	10
Dobles	—	2	2
Tripletos	—	—	—
Embarazos en curso	2	7	9

Instituto Mexicano de Infertilidad (IMI), 2004-2008.

*Defecto de pared interventricular.

menor lesión de la fisiología ovocitaria.²⁴ Borini y colaboradores han señalado que protocolos subóptimos para criopreservación de ovocitos pueden causar daño subletal relacionado con habilidad limitada para la fecundación;²⁵ en este estudio se observó que en forma proporcional la mejor supervivencia se corresponde con mejores tasas de fecundación y clivaje.

En este protocolo se informaron tasas de supervivencia, fecundación y clivaje comparables con las notificadas por otros autores para la vitrificación de ovocitos humanos, cualquiera que fuera el dispositivo utilizado para el depósito final de los ovocitos (*cryotop*, *cryotip*, *cryoloop*, *cryoleaf*, etc.).²⁶⁻³⁰

La proporción de embarazo es similar a la comunicada para ciclos en fresco, de forma indistinta respecto de cuando se transfirieron embriones obtenidos a partir de ovocitos propios o donados vitrificados. Hasta el momento, los nacidos informados para la vitrificación de ovocitos parece tener una incidencia de anomalías congénitas (2.5%) no mayor a la comunicada para los nacidos de embarazos espontáneos en mujeres fecundas o infundadas en ciclos frescos de fecundación *in vitro*.³¹ En esta serie de nacidos vivos ($n=65$) se registró una comunicación interventricular en una niña hija de madre diabética, dato que corresponde al 1.53% de los casos y que muy probablemente no tenga relación con la técnica. En particular, no se realizó ninguna prueba de salud cromosómica en los embriones, pero se consideró que la proporción de nacidos vivos sanos notificada sustenta de alguna manera la seguridad de la técnica.

CONCLUSIÓN

La vitrificación de ovocitos humanos en *cryotop* proporciona elevada supervivencia ovocitaria, fecundación, clivaje y embarazo. Es una técnica sencilla y altamente

reproducible que puede beneficiar a parejas con necesidad de postergar la posibilidad de embarazo, incluidos las pacientes oncológicas. Con ella, los centros de reproducción asistida pueden ofrecer una opción distinta y desestimular la demanda de congelación de embriones.

Bibliografía

- Chen C. Pregnancy after human oocytes cryopreservation. *Lancet* 1986; 11:884-886.
- Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006; 86:78-80.
- Al-Hasani S, Diedrich K, van Der Ven H, Reinecke A, Hartie M, Krebs D. Cryopreservation of human oocyte. *Hum Reprod* 1987; 2:695-2700.
- Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB. Clinical application of human eggs cryopreservation. *Hum Reprod* 1998; 13:3156-3159.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspective regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001; 16:411-416.
- Stachecki JJ, Cohen J and Willadsen SM. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology* 1998; 37:346-354.
- Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, Pasqualini RS. Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium. *Hum Reprod* 2002; 17:3149-3152.
- Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fartto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:33-37.
- Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C and Coticchio. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2006; 21(2):512-517.
- Shee-Huan Chen, Yih-Ron Lien, Hsin-Fu chen, Li-Jung Yang, Yi-Yi Tsai, Yu-Shih Yang. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2 propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20(7):1975-1980.
- Rall WF, Fahy GM. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313-573.
- Trounson A. Freezing human eggs and embryos. *Fertil Steril* 1986; 46: 1-12.
- Bianchi V, Coticchio G, Fava L, Flamigni C, Borini A. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2005; 20(4):1078-1083.
- Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 2007; 22:207-216.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990; 54:102-108.
- Zenses MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effect of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindle in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75:769-777.
- Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri PN y Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configuration of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* 2002; 17:1885-1891.
- Rienzi L, Martínez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, Tesarik J, Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 2004; 19:655-659.
- Cobo A, Rubio C, Gerli S, et al. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75:354-360.
- Cobo A, Perez S, De los Santos MJ, Zulategui J, et al. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod BioMed Online* 2008; 1(3):350-359.
- Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, et al. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999; 72:142-146.
- Lieberman J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction* 2002; 124:483-489.
- Lieberman J, Tucker MJ, Sills ES. Cryoloop vitrification in assisted reproduction: analysis of survival rates in >1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants. *Clin Exper Obst Gynecol* 2003; 30:125-129.

24. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, *et al.* Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology* 2007; 67:64-72.
25. Borini A, Bonu AM, Coticchio G, Bianchi V, *et al.* Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2004; 82:601-605.
26. Katayama. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 80(1):223-224.
27. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, *et al.* *Hum Reprod* 2003;18(2):384-391.
28. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, *et al.* Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod BioMed Online* 2005;11: 300-308.
29. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, *et al.* Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85:108-11.
30. Kim TJ, Hong S, Cha K.Y. Vitrified oocytes produce excellent pregnancy rate. *Fertil Steril* 2006; 86(2):126-127.
31. Chian R.C, Huang JY, Tan SL, Lucena E, *et al.* *Reprod BioMed Online* 2008; 16(5):608-610.