

Vitrificación de ovocitos y embriones

Martha Isolina García Amador,* Rocío Martínez Armas,* Luis Arturo Ruvalcaba Castellón*

RESUMEN

En 1983, Trounson y colaboradores fueron los primeros en sumergir un ovocito directamente en nitrógeno líquido con tasas aceptables de supervivencia y fertilización, pero bajas de segmentación. En 1984, Zeilmarker y su grupo reportaron el primer nacimiento luego de transferir embriones descongelados. En este artículo se revisan los aspectos generales de esta técnica y los resultados de la vitrificación de ovocitos, cigotos y embriones.

Palabras clave: vitrificación, criopreservación, vitrificación de ovocitos, vitrificación de embriones.

ABSTRACT

In 1983, Trounson et al submerged an oocyte directly on liquid nitrogen with acceptable rates of survival and fertilization, but low rates of cleavage. In 1984, Zeilmarker et al reported the first birth after transferring defrosted embryos. This paper reviews the general aspects of vitrification technique, as well as the results of the oocytes, cygotes and embryos vitrification.

Key words: vitrification, cryopreservation, oocyte vitrification, embryo vitrification.

En 1983 Trounson y col.¹ fueron los primeros en sumergir un ovocito directamente en nitrógeno líquido con aceptables tasas de supervivencia y fertilización, pero bajas de segmentación. En 1984, Zeilmarker y col. comunicaron el primer nacimiento luego de transferir embriones descongelados.²

El primer nacido de un ovocito criopreservado fue reportado por Chen en 1986, quien utilizó la congelación lenta y dimetilsulfóxido (DMSO).³ Esta técnica fue mejorando a través de los años como resultado de cambios en los componentes de los medios de cultivo utilizados: medios basados en colina,⁴ reducidos en so-

dio,^{5,6} optimización de crioprotectores^{7,8} y, por supuesto, de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI),⁹ que generó nuevas promesas en factor masculino severo y marcó un punto de inflexión en la fertilización hasta entonces limitada por el endurecimiento de la zona pelúcida ovocitaria secundario a las bajas temperaturas durante el proceso de congelación.^{10,11}

Rall y Fahy¹² establecieron que la vitrificación consistía en solidificar una solución por enfriamiento rápido. Al inducir un estado vídrio por elevación extrema de su viscosidad, demostraron su aplicación práctica en la criopreservación de embriones mamíferos y la consideraron una alternativa potencial a la congelación lenta.

Kuleshova y col.,¹³ en 1999, reportaron el primer nacido vivo derivado de la vitrificación de ovocitos humanos, luego de vitrificar 17 ovocitos con etilenglicol (40%) y 0.6 M/L de sucrosa en *open pulled straws* (OPS). Desde su descripción, importantes modificaciones han nutrido la técnica potenciando resultados que demuestran su eficacia y seguridad clínica.

ASPECTOS TERMINOLÓGICOS RELACIONADOS

Una revisión a la terminología empleada para los procesos criobiológicos implicados en la vitrificación ha

* Instituto Mexicano de Infertilidad, Guadalajara, Jalisco.

Correspondencia: Dra. Martha Isolina García Amador. Instituto Mexicano de Infertilidad. Blvd. Puerta de Hierro 5150-503C, colonia Plaza Corporativa Zapopan, CP 45116, Zapopan, Jalisco. Correo electrónico: mgarciaamador@yahoo.com
Recibido: febrero, 2011. Aceptado: abril, 2011.

Este artículo debe citarse como: García-Amador MI, Martínez-Armas R, Ruvalcaba-Castellón LA. Vitrificación de ovocitos y embriones. Rev Mex Reprod 2011;3(4):143-149.

www.nietoeditores.com.mx

sido realizada recientemente. Shaw y Jones, en 2003, establecieron claramente el significado en criobiología de los términos *congelación* (*freezing*) y *descongelación* (*thawing*), y afirmaron que sólo podían usarse para procedimientos donde se formaran o derretieran cristales de hielo (como sinónimo de deshielo o derretimiento).¹⁴ *Cooling* y *warming*, cuyo significado en inglés es enfriamiento y calentamiento, sólo se refieren a cambios de temperatura y pueden utilizarse indistintamente para la congelación tradicional y para la vitrificación. El consenso actual entre los criobiólogos es usar los términos congelación-descongelación para la congelación lenta y procesos relacionados, y calentamiento-enfriamiento para la vitrificación, es decir, términos vinculados con los cambios de temperatura y no de formación y derretimiento de cristales de hielo.

Con base en estos argumentos, se ha propuesto, como primer paso en la dirección correcta, reemplazar de manera adecuada los términos en las etiquetas de los medios de vitrificación, como soluciones de calentamiento (*warming solutions*) en lugar de soluciones de descongelación (*thawing solutions*).¹⁵

VITRIFICACIÓN

Es la solidificación de una solución a bajas temperaturas, no por cristalización, sino por elevación de su viscosidad (Rall y Fahy, 1985), y supone el uso de crioprotectores en mínimo volumen y elevadas concentraciones a velocidad ultra-rápida de enfriamiento.

Aspectos generales de la técnica

En la vitrificación, la célula y su entorno se solidifican en una forma similar al vidrio sin que se formen cristales de hielo. Es una técnica en la que se utilizan altas concentraciones de crioprotectores en mínimo volumen y elevadas velocidades de enfriamiento (15,000-30,000°C/min),¹⁶ lo que genera como consecuencia la ausencia de cristales de hielo durante los procesos de congelación-descongelación,¹⁷ una mejor conservación de la ultraestructura y menor daño a la fisiología ovocitaria.¹⁸ Borini y col. señalaron que los protocolos subóptimos para criopreservación de ovocitos pueden causar daño subletal vinculado con capacidad limitada para la fertilización.¹⁹

La alta osmolaridad de la solución de vitrificación rápidamente deshidrata la célula. Sumergirla bruscamente en nitrógeno líquido la solidifica, de manera que el agua intracelular no tiene tiempo para formar cristales y provocar daño a los organelos intracelulares, lo que incrementa su potencial de supervivencia.²⁰

Algunos autores siguen mostrando preocupación por las altas concentraciones de crioprotectores utilizadas, por su potencial citotoxicidad y por la posibilidad de contaminación relacionada con el uso de sistemas abiertos.²¹

Contaminación cruzada

Se ha mencionado el riesgo de contaminación cruzada por patógenos bacterianos o virales secundario al uso de sistemas abiertos que permiten el contacto directo con el nitrógeno líquido, e incluso con el vapor de éste, en los tanques de almacenamiento.^{22,23}

Al respecto se ha sugerido filtrar el nitrógeno con un filtro de 0.2 µm, el cual puede eliminar bacterias y hongos, para luego almacenarlo en el tanque de nitrógeno líquido en fase de vapor, o exponerlo a luz ultravioleta. Se destaca la incapacidad que tienen algunos gérmenes para penetrar una zona pelúcida intacta e infectar la célula.²⁴ También contribuyen a disminuir la posibilidad de contaminación los lavados a los que se someten los ovocitos y los embriones luego de ser descongelados, y los sistemas secos de almacenamiento.

Se ha propuesto la colocación de las muestras y las herramientas (*cryotop*, *open pulled straws*, OPS, etcétera) después del enfriamiento en el interior de pajillas preenfriadas, preferiblemente de alta seguridad (CBS Strauss), selladas al calor y almacenadas en contenedores comunes sin peligro de contaminación cruzada. Para el enfriamiento, puede cortarse uno de los extremos de la pajilla, removerse la herramienta con la muestra y sumergirse directamente en el medio de calentamiento. Este abordaje fue usado por Vajta, en 1998, y Bielanski y Animan lo probaron recientemente.²⁵

Isachenko y col. compararon los resultados obtenidos al vitrificar 376 embriones pronucleares a los que previamente se les había realizado biopsia, asignados al azar a uno de dos grupos (cada grupo de 183 embriones). En el grupo 1 la vitrificación se hizo en pajillas abiertas y estiradas (*open pulled straw*, OPS) que se colocaron directamente en nitrógeno líquido (vitrificación directa);

en el otro grupo, se hizo en una pajuela estéril de inseminación de 90 mm cerrada (sistema aséptico; OPS, *straw in straw*). Las tasas de desarrollo a blastocisto expandido después de cultivo *in vitro* fueron de 25% en el grupo con vitrificación directa, y de 23% en el grupo con *straw in straw*, y se concluyó que la vitrificación de embriones pronucleares, sometidos previamente a biopsia, colocados en pajillas estiradas abiertas (OPS) y en un recipiente herméticamente cerrado, antes de sumergirla en el nitrógeno líquido, permite un aislamiento confiable, evita la contaminación por microorganismos patógenos y no afecta la supervivencia si hay descongelación rápida con remoción simultánea de los crioprotectores.²⁶

La realización de un estudio serológico, cervical o seminal para *Mycoplasma*, ureaplasma, virus de la hepatitis B o C, VIH, herpes tipo II, entre otros, en todas las parejas contempladas para ciclo de reproducción asistida, ovodonadoras y donantes de semen permitirá un doble mecanismo de protección ante el riesgo de contaminación cruzada.

En el Instituto Mexicano de Infertilidad (IMI), de Guadalajara, Jalisco, los ovocitos de metafase II identificados por la extrusión del primer cuerpo polar, excedentes o destinados por alguna otra indicación, son vitrificados en cryotop según la técnica descrita por Kuwayama.²⁷ Existen otros dispositivos para vitrificar ovocitos, embriones, o ambos (Cuadro 1).

Técnica

Inicialmente, los ovocitos se depositan en la solución de equilibrio que contiene etilenglicol a 7.5% y dimetilsulfóxido a 7.5% (ES), haciendo puentes entre las gotas

con la pipeta Pasteur en dos ocasiones cada tres minutos hasta completar 10 minutos.

Luego, se trasladan a la solución de vitrificación, compuesta por etilenglicol a 15%, dimetilsulfóxido a 15% y sucrosa (0.5 M, VS). En ésta son aspirados y devueltos tres o cuatro veces antes de ser depositados sobre la superficie del cryotop (Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japón).

Finalmente, el cryotop se sumerge en nitrógeno líquido para la colocación de su cubierta protectora y ser almacenado en el tanque de nitrógeno.

Calentamiento o descongelación

1. Los ovocitos se depositan en solución descongelante (TS) a 37°C durante un minuto. Seguidamente en solución diluyente (DS) por tres minutos, y después se trasladan a la solución de lavado (WS1) durante cinco minutos y (WS2) por cinco minutos más.

2. Los ovocitos supervivientes se dejan en medio de cultivo dos a cuatro horas y posteriormente se microinyectan mediante la técnica convencional de inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Se han hecho algunas modificaciones a la técnica original, principalmente en cuanto a tiempos y volúmenes, en diferentes pasos. Se incorporará un nuevo suplemento en la solución de vitrificación de manera específica (comunicación vía telefónica con el Dr. Masashige Kuwayama), la hidroxipropilcelulosa con la finalidad de mejorar las ya excelentes tasas de supervivencia, fertilización y segmentación.

Resultados de la vitrificación de ovocitos

Kuwayama reportó el primer embarazo a partir de ovocitos vitrificados utilizando cryotop en el año 2002, en Japón. Los resultados publicados en 2005 fueron: supervivencia de 91% (58/64), segmentación de 81%, embriones en estadio de blastocisto en 50%, implantación de 11.2% (12/107), y 41% de embarazos por embrión transferido.²⁸ En la actualidad, muchos centros de reproducción en todo el mundo han implantado su técnica con excelentes resultados y reproducibilidad.

Katayama²⁹ reportó, luego de la descongelación de ovocitos vitrificados, índices de supervivencia de 94%; de fertilización por inyección intracitoplasmática de espermatozoides de 91% y división celular de 90%. Kim

Cuadro 1. Algunas herramientas o dispositivos utilizados para la vitrificación de ovocitos o embriones

<i>Autores</i>	<i>Dispositivo</i>
Kuleshova (1999), Chen (2000), Cuello (2008)	<i>Open pull straw</i> (OPS)
Park (1999), Yoon (2000), Son (2003)	Cooper Grids
Papis (2000)	Microdrops
Lieberman (2002), Vanderzwalm (2003)	Hemistraw
Katayama (2003), Kuwayama (2005)	Cryotop
Lane (2001), Mukaida (2001)	Croloop
Kuwayama (2005)	Cryotip
Lin, Chen Chiang (2008)	Cryoleaf

(2006) encontró un índice de supervivencia de 81%, y de fertilización y división celular de 63.8 y 95.9%, respectivamente;³⁰ Lucena y col. (2006), de 8.2% (13/159);³¹ Antinori y su grupo (2007), de 11.8% (39/330);³² Cobo (2008) obtuvo cifras de supervivencia de 96.9% y de fertilización de 76.3%;³³ mientras que Schoolcraft y col. (2009) registraron tasas de implantación por ovocito “desvitrificado” de 8.8% (14/160).³⁴

En un estudio multicéntrico se publicaron resultados obstétricos y perinatales de 165 embarazos (200 lactantes) derivados de la vitrificación de ovocitos en cryotop o cryoleaf. La proporción de embarazo múltiple fue de 17% (26 fueron gemelares y dos, triples). Se realizó cesárea en 37% de los embarazos únicos ($n = 51$). El peso promedio de los nacidos únicos fue de $2,920 \pm 37$ g y de $2,231 \pm 55$ g para los múltiples. La incidencia de anomalías congénitas en esa cohorte de nacidos vivos fue de 2.5% (dos defectos septales ventriculares, una atresia biliar, una anomalía ósea en el miembro inferior y un hemangioma de piel, comparable con las concepciones espontáneas en mujeres fértiles, o de mujeres fértiles en ciclos de fertilización *in vitro*).³⁵

Vitrificación y alteraciones en el huso meiótico

El aparato microtubular del huso meiótico es una estructura dinámica que facilita la segregación de los cromosomas en células hijas durante la mitosis y en el primer y segundo cuerpos polares durante la meiosis. Algunos autores han señalado alteraciones en la segregación de los cromosomas durante la meiosis II, derivadas de la exposición a bajas temperaturas.³⁶⁻³⁹ Otros sugieren que el huso meiótico puede sobrevivir a procesos de congelación-descongelación sin consecuencias, o al menos sin incremento en el número de aneuploidías en los embriones resultantes, dado que se pierde durante la congelación y se recupera después de la descongelación y cultivo.⁴⁰⁻⁴³ De Santis considera que éste no debe ser un indicador de la función ovocitaria.⁴⁴

La criopreservación de ovocitos se ha analizado también mediante microscopio de luz polarizada, el cual ofrece la oportunidad de visualizar el huso meiótico de manera no invasora. La estructura ordenada de los microtúbulos del huso genera el fenómeno de birrefringencia que crea una diferencia en contraste entre el huso y el resto de la célula. Esto puede detectarse por medio de

algún método de imágenes, como el poloscopio, que amplifica las señales de birrefringencia y hace cuantificable el grado de orientación de los microtúbulos.⁴⁵

Notola y col. (2009) evaluaron, mediante microscopía electrónica y de manera comparativa, los posibles efectos que los protocolos de vitrificación pueden tener en las características ultraestructurales de ovocitos vitrificados en cryoleaf y cryoloop. Específicamente, se valoró la presencia y extensión de vacuolas citoplasmáticas, la calidad de los organelos, la textura de la zona pelúcida, la integridad del citoplasma, la apariencia del espacio perivitelino y el arreglo del huso meiótico. Se analizó el comportamiento de 35 ovocitos, 10 vitrificados en cryoleaf, 10 en cryoloop y 15 en el grupo control (fresco). Estos ovocitos mostraron características similares a los ovocitos en fresco en cuanto a forma y textura del citoplasma. En los tres grupos (los dos de vitrificación y el fresco) se observaron vacuolas esporádicas. El número de gránulos corticales estuvo anormalmente reducido en los ovocitos criopreservados, y en algunas ocasiones estuvo vinculado con una compactación incrementada del aspecto interno de la zona pelúcida.⁴⁶

También se han descrito características atípicas, como una tendencia a la elongación del huso, protrusión de los cromosomas fuera del mismo y aumento en la distancia polo-polo de la mano de una disminución en lo ancho (en la porción ecuatorial) del huso meiótico (14.9 ± 2.3 μm) en comparación con el control en fresco (12.4 ± 2.6 μm) [$p = 0.001$].⁴⁷

La repercusión de algunas manifestaciones continúa siendo incierta, y para algunos autores es razonable sospechar que podrían indicar un incremento en el riesgo de errores meióticos.⁴⁸

Vitrificación de cigotos

De manera teórica, puede hacerse la vitrificación a los embriones en todos los estados de preimplantación. No hay suficiente sustento científico para aseverar cuál de los estados embrionarios en particular tolera mejor los cambios que implica la técnica, además de que las diferencias estructurales limitan la comparación. Aunque para algunos la congelación en pronúcleos pareciera ser el estado ideal para la criopreservación embrionaria,⁴⁹ no es en realidad el estadio más común de criopreservación del excedente en fresco en un ciclo de fertilización *in*

vitro. Uno de los inconvenientes descritos del embrión en otras etapas de desarrollo es que la apariencia morfológica no aporta suficientes elementos que permitan intuir su calidad y potencial implantatorio.

En un estudio realizado en el Instituto Mexicano de Infertilidad (IMI) de julio de 2006 a enero de 2008 se evaluó la supervivencia, segmentación y proporción de embarazos tras la vitrificación y descongelación de 104 cigotos y 314 embriones en cuatro células. La edad promedio fue de 34.6 ± 4.9 años ($n = 26$) para el grupo I, y de 33.8 ± 4.5 años para el grupo II ($n = 85$). La supervivencia fue de 86 y 89%, respectivamente. En el grupo I, la proporción de embarazos fue de 50% (13/26) y no hubo pérdida gestacional. En el grupo II, fue de 28% (24/85), y hubo tres pérdidas gestacionales. No se encontraron diferencias significativas al comparar edad, porcentajes de supervivencia ni promedio de embriones transferidos; sí las hubo en la proporción de embarazo ($\chi^2 = 5.22$; gl 1; $p < 0.05$).⁵⁰

Vitrificación de embriones

En 2007 Ali y col. observaron que una disminución en la velocidad de congelación reducía las tasas de supervivencia embrionaria y debía ser compensada por altas concentraciones intracelulares de crioprotectores.⁵¹ La exposición a los crioprotectores también puede ser dañina, aun cuando no haya congelación, si no se realiza en la forma correcta.⁵²

En un metanálisis reciente se compararon los resultados obtenidos en la criopreservación de embriones por congelación lenta y vitrificación. Sólo se eligieron cuatro de 873 estudios, tres de los cuales eran ensayos controlados con asignación al azar. Se compararon 8,824 blastocistos congelados por vitrificación ($n = 7,482$) vs congelación lenta ($n = 1,342$). Las tasas de supervivencia y de segmentación embrionaria fueron significativamente mayores después de la vitrificación, en comparación con la congelación lenta (razón de momios: 15.57, intervalo de confianza de 95%: 3.68 a 65.82; al azar modelo de efectos). La revisión concluyó que la vitrificación está vinculada con tasas de supervivencia significativamente mayores que la congelación lenta.⁵³ Debido a que sólo un pequeño número de blastocistos está disponible para la criopreservación, es necesaria una forma simple, rápida y confiable para optimizar el

resultado de la transferencia. Mukaida, en 2001, reportó el primer nacimiento exitoso después de la transferencia de blastocistos humanos vitrificados utilizando el cryloop,⁵⁴ y subsecuentemente encontró altas tasas de supervivencia (87.5%), implantación (29%) y embarazo (44%) después de 223 ciclos usando cryloop.⁵⁵

Zhang y col., en 2009, criopreservaron embriones en los días 3, 4 o 5 después de la biopsia, y compararon los resultados luego de vitrificarlos (tres horas después de la biopsia) con los de un grupo control. La vitrificación la realizaron con cryoleaf (Medicult). Obtuvieron tasas similares de supervivencia para los embriones vitrificados en estado de mórula (tras biopsia y sin biopsia): 87.5 vs 92%, $p = 0.037$. La supervivencia en los blastocistos fue mayor para el grupo de biopsia (95.7%) que para el de control (81.4%), $p = 0.035$.⁵⁶

Revitricación de embriones

En estudios previos se ha evaluado la seguridad de los ciclos de congelación y recongelación usando embriones de ratón, y se ha demostrado que éstos podían sobrevivir a tres ciclos de congelación-descongelación y ser capaces de desarrollarse *in vitro*⁵⁷⁻⁵⁹ tras la recongelación (congelación lenta).

Hace poco, Takahashi y Araki (2004) reportaron el nacimiento de un bebé saludable derivado de un embrión revitrificado en estado de blastocisto.⁶⁰ Yoko y col.⁶¹ hicieron un estudio comparativo con pacientes en ciclo de *in vitro* a las que se les transfirieron embriones vitrificados inicialmente en estado de pronúcleos, que fueron descongelados y revitrificados en estado de mórula o blastocisto por tener todavía embriones supernumerarios, y un grupo control en el que se transfirieron embriones tras un solo ciclo de vitrificación. La tasa de cancelación que encontraron fue de 28% para el grupo de estudio vs 17.4% para el grupo control, diferencia estadísticamente no significativa, con tasas de supervivencia similares: 84 vs 88.9%. Las tasas de embarazo por ciclo de transferencia fueron de 27.8 vs 25.9%. La proporción de aborto espontáneo fue de 32 vs 20% (diferencia no significativa).

En 2009, Ruvalcaba y col.⁶² reportaron un embarazo exitoso a partir de ovocitos vitrificados donados, revitrificación en estadio de cuatro células con posterior “descongelación” y transferencia en el mismo estadio.

De momento, ésta es una herramienta que puede utilizarse en casos estrictamente necesarios; deberán realizarse más estudios para avalar su seguridad clínica. Es fundamental que se informe a la pareja de los beneficios y riesgos de continuar el tratamiento. Conviene, para prevenir embriones excedentes después de una primera vitrificación, que al momento de la aspiración sólo se insemine una parte razonable de los ovocitos que genere un justo número de embriones; en el caso de vitrificación de embriones, no deben pasar de tres o cuatro por herramienta (cryotop, cryoleaf, cryoleaf, etcétera).

CONCLUSIÓN

La vitrificación es un método simple que ha revolucionado la criobiología y es de gran utilidad clínica en los centros de reproducción asistida. Al margen del dispositivo utilizado (cryotop, cryoleaf, cryoloop, etcétera), los resultados alcanzados en el orden de supervivencia y preservación de la función han demostrado que es una técnica segura, reproducible y de alto rendimiento.

REFERENCIAS

1. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305:707-709.
2. Zeilmaker GH, Alborda AT, Van Gient Y, Rijkmans CMPM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984;42:293-296.
3. Chen C. Pregnancy after human oocytes cryopreservation. *Lancet* 1986;11:884-886.
4. 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.
5. Boldt J, Tidswell N, Sayers A, Kilani R, Cline D. Human oocyte cryopreservation: 5 years experience with a sodium depleted slow freezing method. *Reprod BioMed Online* 2006;13:96-100.
6. Boldt J, Cline D, McLaughlin D. Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF- embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2003;18:1250-1255.
7. Fosas N, Marina F, Torres PJ, Jové I, et al. The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes. *Hum Reprod* 2003;18:1417-1421.
8. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, et al. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16:411-416.
9. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirterghem A. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into a oocyte. *Lancet* 1992;340:17-18.
10. Van Steirterghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8:1061-1066.
11. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, et al. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;68:724-726.
12. Rall WF, Fahy GM. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.
13. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: Case report. *Hum Reprod* 1999;14:3077-3079.
14. Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:583-605.
15. Vajta G, Nagy ZP, Cobo A, Conceicao J, Yovich J. Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. *Reprod BioMed Online* 2009;19(S3):1-7.
16. 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.
17. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology* 2007;67:64-72.
18. 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.
19. Borini A, Bonu MA, Coticchio G, Bianchi V, et al. Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2004;82:601-605.
20. 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.
21. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995;346:137-140.
22. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000;40:110-116.
23. Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003;46:146-152.
24. Fountain D, Ralston M, Higgins N, Gorlin JB, et al. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion* 1997;37:585-591.
25. Bielanski A, Hanniman A. Non-cross-contamination of bovine embryos with microbes using the OPS vitrification system. *Reprod Fertil Dev* 2007;29:232(abstrat).
26. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, van der Ven Hans. Vitrification of mouse pronuclear embryos after polar body biopsy without direct contact with liquid nitrogen. *Fertil Steril* 2005;84(4):1011-1016.
27. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007;67:73-80.

28. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod BioMed Online* 2005;11:300-308.
29. Katayama P, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80:223-224.
30. Kim TJ, Hong S, Cha KY. Vitrified oocytes produce excellent pregnancy rate. *Fertil Steril* 2006;86(2):126-127.
31. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, et al. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006;85:108-111.
32. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, et al. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod BioMed Online* 20007;14:72-79.
33. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, et al. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008;89:1657-1664.
34. Schoolcraft W, Keller J, Schienker T. Excellent embryo quality obtained from vitrified oocytes. *Reprod BioMed Online* 2009;19(6):820-823.
35. Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, et al. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod BioMed Online* 2008;16(5):608-610.
36. 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.
37. 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.
38. Zenses MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effect of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril* 2001;75:769-777.
39. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Hum Reprod* 2001;16:2374-2378.
40. Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, et al. 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.
41. Rienzi L, Martínez F, Iacobelli M, Minasi MG, et al. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 2004;19:655-659.
42. Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, 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.
43. Cobo A, Pérez 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.
44. De Santis I. Polar body morphology and spindle imaging as predictor of oocyte quality. *Reprod BioMed Online* 2005;11:36-42.
45. Keefe D, Liu L, Wang W, Silva C. Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF. *Reprod BioMed Online* 2003;7:24-29.
46. Nottola SA, Coticchio G, Sciajno R, Gambardella A, et al. Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. *Reprod BioMed Online* 2009;19(Suppl.3):17-27.
47. Coticchio G, Bromfield JJ, Gambardella A, Scaravelli G, et al. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod BioMed Online* 2009;19(S3):29-34.
48. Bromfield JJ, Coticchio G, Hutt K, Sciajno R, et al. Meiotic spindle dynamics in human oocytes following slow-cooling cryopreservation. *Hum Reprod* 2009;24:2114-2123.
49. Damarío MA, Hammit DG, Galanits TM, Session DR, Dumesic DA. Pronuclear stage cryopreservation after intracytoplasmic sperm injection and conventional IVF: implications for timing of the freeze. *Fertil Steril* 1999;72:1049-1054.
50. García MI, Martínez R, Ruvalcaba LA. Estadío conveniente para vitrificación en cryotop; cigoto *versus* embrión en estadío de 4 células. 9º Taller de la Red Latinoamericana de Reproducción. Cancún, 2009.
51. Ali J, Shelton J. Development of vitrification solutions. In: Tucker M, Lieberman J, editors. *Vitrification in assisted reproduction: A User's Manual and Trouble-Shooting Guide*. London: Informa Healthcare; 2007:3-44.
52. Paynter S. A rational approach to oocyte cryopreservation. *Reprod BioMed Online* 2005;5:578-586.
53. Kalliope L, Kolibianakis E, Venetis C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008;90:186-193.
54. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, et al. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 2001;76:618-620.
55. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloop: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 2003;18:384-391.
56. Zhang X, Trokoudes MK, Pavlides C. Vitrification of biopsed embryos at cleavage, morula and blastocyst stage. *Reprod BioMed Online* 2009;19:526-531.
57. Macnamee M, Wick K, Rainsbury P, Sathanandan M, et al. How robust are early human embryos? *Lancet* 1990;8:636.
58. Baker A, Check JH, Lurie D, Hourani C, Hoover L. Pregnancy achieved with pronuclear-stage embryos that were cryopreserved and thawed twice: a case report. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:713-715.
59. Farhat M, Zentner BS, Lossos F, Bdolah Y, et al. Successful pregnancy following replacement of embryos previously: a case report. *Hum Reprod* 2001;16:337-339.
60. Takahashi T, Araki Y. Successfully healthy baby delivery from human refrozen blastocyst embryos by vitrification. *J Mamm Ova Res* 2004;21:162-165.
61. Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, Arayaki Y. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertil Steril* 2009;91(2):383-386.
62. Ruvalcaba LA, García MI, Medina FJ, Montoya J y col. Embarazo exitoso derivado de ovocitos donados vitrificados y revitrificados en estadío de cuatro células utilizando el cryotop. Reporte de caso. *Rev Mex Reprod* 2009;2(1):36-37.