

Resultados de tres años de experiencia en vitrificación para banco de óvulos

Silvio Cuneo Pareto,* Sergio Sánchez González,* Sandra Cubillos García*

RESUMEN

Objetivo: mostrar que la vitrificación ovocitaria acompañada del cultivo secuencial es una combinación segura para el éxito de los programas de donación de óvulos.

Material y método: los óvulos de 30 ciclos de donación (310 óvulos) se vitrificaron de mayo de 2006 a diciembre de 2009. Estudiamos 16 ciclos de pacientes receptoras de estos óvulos desvitrificados. Como grupo control se incluyeron 48 pacientes receptoras de óvulos donados frescos (600 óvulos). Los ovocitos se vitrificaron con el método Cryotop. Se desvitrificaron 154 óvulos y a cada receptora se asignaron, en promedio, 9.6 óvulos en metafase II. Los ovocitos supervivientes se fertilizaron por ICSI y se cultivaron hasta los días 5 o 6 de acuerdo con la evolución embrionaria. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para el análisis estadístico, con significancia estadística de $p < 0.05$.

Resultados: en el grupo vitrificado las tasas de embarazo, de implantación y de aborto fueron de 66.6, 31 y 22.2%, respectivamente. En el grupo de óvulos frescos las mismas tasas fueron de 70.5, 36.1 y 13%, respectivamente. No hubo diferencias estadísticas entre ambos grupos.

Conclusiones: nuestros excelentes resultados clínicos indican la seguridad de la vitrificación para la creación de bancos de óvulos a ser utilizados en programas de donación con fines reproductivos humanos. El cultivo secuencial es una estrategia viable para poder seleccionar los embriones con mejor potencial de implantación para transferir. Se necesitan más estudios para confirmar nuestros resultados.

Palabras clave: vitrificación, preservación de la fertilidad, donación ovular, banco de óvulos.

ABSTRACT

Objective: To show that oocyte vitrification and the sequential culture are a safe combination to have a viable success in an oocyte donation bank program.

Material and method: Thirty cycles of oocytes donors (310 oocytes) were frozen by vitrification. We studied 16 patient's cycles of thawed oocytes receptors, from May 2006 to December 2009. As a control group we included 48 patient's cycles of fresh oocyte receptors (600 oocytes). Oocytes were vitrified with the Cryotop method. One hundred fifty-four oocytes were thawed, and a mean of 9.6 metaphase II oocytes were assigned for each recipient. The survived oocytes were fertilized by ICSI and cultured until day 5 or 6 according to embryo development. Mann-Whitney U-tests were carried out. Significance was defined as $p < 0.05$.

Results: In the vitrified oocytes group, pregnancy, implantation and miscarriage rates were: 66.6%, 31.6% and 22.2%, respectively. In the fresh oocyte group, the same rates were: 70.5%, 36.1% and 13%, respectively. No statistical differences were found between both groups.

Conclusions: Our excellent clinical outcome indicates the safety to use the vitrification to create oocyte donation bank programs for human reproductive purposes. Sequential culture is a viable strategy to consider selecting embryos with a high potential implantation to transfer. More studies should be done to confirm these results.

Key words: vitrification, fertility preservation, oocyte donation, oocyte banking.

* Laboratorio de Reproducción Asistida, SA de CV. Concibe reproducción asistida.

Correspondencia: Dr. Silvio Cuneo Pareto. Av. Paseo de las Palmas 745-405, colonia Lomas de Chapultepec, CP 11000, México, DF. Correo electrónico: scuneo@concibe.com.mx
Recibido: febrero, 2010. Aceptado: abril, 2010.

Este artículo debe citarse como: Cuneo-Pareto S, Sánchez-González S, Cubillos-García S. Resultados de tres años de experiencia en vitrificación para banco de óvulos. Rev Mex Reprod 2010;2(4):96-100.

www.nietoeditores.com.mx

El banco de óvulos es la mejor opción no sólo para preservar la fertilidad de la mujer, sino también para disminuir el tiempo y costo de la donación de óvulos. Con esta opción se asegura tener mejores oportunidades de asignar a la paciente el perfil que desea y se evita el arrepentimiento en el tratamiento por las largas listas de espera. Los pocos datos clínicos disponibles revelan que hay dudas acerca de la vitrificación de óvulos por ser una técnica reciente y un sistema abierto de congelación, por los efectos que puede ocasionar en el ovocito (como daño en el alineamiento de la cromatina o liberación prematura de gránulos corticales^{1,2}) y por tener menos de 1,500 niños nacidos vivos.³ El desarrollo embrionario a blastocisto permite una selección propia por parte del embrión y excluye a los que estén en arresto o bloqueo embrionario por la activación del genoma del embrión.^{4,5} Es así como el cultivo a blastocisto se ha usado para transferencia de embrión único, cuando hay fallas de implantación o reducción en el número de embriones a transferir y a congelar.⁶⁻⁹ Nuestro objetivo fue demostrar que la vitrificación de óvulos y el cultivo secuencial de los embriones derivados de ésta representan un método seguro y viable para el éxito del programa Cryodon® (banco de óvulos vitrificados).

PACIENTES Y MÉTODO

Se realizó un estudio retrospectivo y comparativo en Concibe reproducción asistida, en la Ciudad de México. Se incluyeron 31 receptoras de ovocitos descongelados (Cryodon®). Los óvulos se vitrificaron por el método Cryotop. Los principales datos analizados fueron: tasas de embarazo, de implantación y de aborto. Todas las donantes debían tener fertilidad comprobada *in vitro* o *in vivo* para poder ser incluidas como donantes de óvulos en fresco o congelados y ser menores de 30 años de edad. Se estimularon con protocolos de regulación a la baja. Las receptoras iniciaron la administración de progesterona el día de la descongelación de los óvulos. Los óvulos de 30 donantes se vitrificaron de mayo de 2006 a diciembre de 2009 y se descongelaron óvulos para 31 receptoras de junio de 2006 a diciembre de 2009. Como grupo control, 33 mujeres donaron óvulos en fresco a 48 receptoras de junio de 2006 a diciembre de 2009 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de las pacientes estudiadas

Programa Protocolo	Donantes Regulación a la baja	Receptoras Ciclo sustituido
Cryodon		
Número de ciclos	30	31
Edad	23.5	40.5
Media de óvulos aspirados/ asignados		9.6
En fresco		
Número de ciclos	33	48
Edad	22.9	40
Media de óvulos aspirados/ asignados		12.5

Se vitrificó cada ovocito en metafase II con la técnica Cryotop, con 15% de etilenglicol y 15% de propanediol, y al desvitrificar se usaron 0.5 M de sucrosa.¹⁰ En el programa Cryodon® los ovocitos que supervivieron a la descongelación se fertilizaron por ICSI, y en el programa tradicional, por FIV e ICSI, según el caso particular de cada paciente. Los ovocitos fecundados (cigotos) se cultivaron hasta el momento de la transferencia en los días 5 o 6, según el desarrollo embrionario. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS. Debido a que los datos no tienen una distribución normal, se usó la estadística no paramétrica para comparar los ciclos en fresco vs los congelados mediante el uso de la prueba U de Mann-Whitney. Para medir las variables cuantitativas se usó la ji al cuadrado; se consideró significancia cuando la *p* fue menor de 0.05.

RESULTADOS

Se asignaron 600 ovocitos frescos y se congelaron 310; la tasa de supervivencia a la vitrificación fue de 96.4% y la de fecundación, de 85.2%, sin encontrar diferencia significativa en comparación con el programa en fresco. En cuanto a la tasa de fecundación anormal y de ovocitos degenerados, sí hubo diferencias significativas (1.6 y 3%, respectivamente, en el programa Cryodon®, Cuadro 2).

La calidad embrionaria se evaluó los días 2 y 3 y en la etapa de blastocisto. La segmentación en los días 2 y 3 fue de 93.3 y 77.3%, respectivamente, sin encontrar diferencias significativas en comparación con el pro-

grama en fresco. El número de células en los días 2 y 3 fue adecuado de acuerdo con los estándares conocidos (Cuadro 3).

De acuerdo con las clasificaciones aceptadas internacionalmente del blastocisto de buena calidad,¹¹ encontramos esta tasa en 42.8%, con una tasa general de formación de blastocisto de 38%; la tasa de congelación de embriones fue de 18.5%. Al comparar estas tasas del programa Cryodon® vs las del programa en fresco se encontró diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 3).

El número de pacientes con transferencia de óvulos en fresco fue de 47 y de 29 con el método Cryodon®,

con una media de embriones de 2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de embarazo, de implantación, de aborto, de embarazo múltiple y de no transferencia (Cuadro 4). La tasa general de embarazo y de implantación en el programa de óvulos donados vitrificados fue de 65.5 y 33.3%, respectivamente.

DISCUSIÓN

El presente estudio encontró una tasa de supervivencia ovocitaria posterior a la desvitrificación de 96.4%, una tasa de fecundación de 85.2% y de formación de

Cuadro 2. Resultado de los óvulos desvitrificados

Parámetros	Óvulos frescos	Óvulos vitrificados	χ^2	Valor de p	
Asignados (n)	600	310			
Tasa de supervivencia	NA	96.4%	0.459	< 0.06	NS
Ovocitos inyectados-inseminados	600	299			
Tasa de fecundación	87.8% (527 de 600)	85.2% (255 de 299)	4.59	0.05	S
Fecundación anormal	16% (10 de 600)	4% (12 de 299)			
Ovocitos degenerados	3% (18 de 600)	6.6% (20 de 299)	6.7	0.05	S

NA: no aplica; NS: sin diferencia estadísticamente significativa; S: diferencia estadísticamente significativa.

Cuadro 3. Características de la segmentación embrionaria

Embriones	Óvulos frescos	Óvulos vitrificados	χ^2	Valor de p	
Segmentación al día 2	94.5% (498 de 527)	93.3% (238 de 255)	623.5	0.18	NS
Número de células al día 2	3.9	3.6			
Segmentación al día 3	80.3% (400 de 498)	77.3% (184 de 238)	578	0.09	NS
Número de células al día 3	7.8	7.5			
Segmentación al día 5	79.9% (219 de 274)	59.3% (76 de 128)	327.5	0.01	S
Segmentación al día 6	64.9% (178 de 274)	54.6% (70 de 128)	453.5	0.01	S
Tasa de formación de blastocisto	44.5% (178 de 400)	38% (70 de 184)	524.5	0.025	S
Blastocistos de buena calidad	60.6% (108 de 178)	42.8% (30 de 70)	6.45	0.05	S
Embriones congelados	47.1% (84 de 178)	18.5% (13 de 70)	17.26	0.05	S

NS: sin diferencia estadísticamente significativa; S: diferencia estadísticamente significativa.

Cuadro 4. Resultados clínicos

<i>Tasa</i>	<i>Óvulos fresco</i>	<i>Óvulos vitrificados</i>	<i>U de Mann Whitney</i>	<i>Valor de p</i>	
Embarazo	70.2% (33 de 47)	65.5% (19 de 29)	649.5	0.671	NS
Implantación	36% (34 de 94)	33.3% (19 de 57)	624	0.457	NS
Aborto	11.7% (4 de 34)	21% (4 de 19)	285.5	0.395	NS
Óvulos transferidos	2% (1 de 48)	6.4% (2 de 31)	712.5	0.34	NS
Embarazo múltiple	2.1% (1 de 47)	6.8% (2 de 29)	1.06	0.06	NS
Número de pacientes transferidas	47 de 48	29 de 31	37.94	0.82	NS
Embriones transferidos	94 (2.0)	54 (1.86)			

NS: sin diferencia estadísticamente significativa; S: diferencia estadísticamente significativa.

blastocisto de 38%, lo cual sugiere que después de la criopreservación por vitrificación los ovocitos mantienen su capacidad fecundante y metabólica. Estos resultados son similares a los comunicados previamente en cuanto a embarazo e implantación.¹²⁻¹⁴ No encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto a los datos del programa de donación en fresco; sin embargo, en la segmentación de los días 5 y 6, en la tasa de formación de blastocisto, en la buena calidad de los blastocistos y en el número de embriones revitrificados del programa Cryodon® sí hubo diferencias estadísticamente significativas que podrían o no correlacionarse con un letargo importante en el desarrollo de estos embriones.

Se han publicado datos que sugieren el riesgo de reacciones cruzadas en el nitrógeno líquido.^{18,19} Una de las críticas al sistema Cryotop es que se trata de un sistema abierto;^{13,20,21} sin embargo, otros reportes han demostrado su seguridad y beneficios, por lo que deben publicarse más datos. En nuestros reportes preliminares encontramos que las pruebas de investigación básica proporcionan seguridad y viabilidad de la vitrificación de los óvulos, que éstos no se dañan y que la formación de embriones para fines reproductivos es segura.^{22,23}

En el futuro cercano, la vitrificación podrá ser un método para la revitrificación de embriones por sus excelentes resultados,¹⁵ su uso no sólo permitirá la apertura de bancos de óvulos donados, sino que además facilitará

la criopreservación de óvulos a las mujeres que quieren postergar su maternidad¹⁶ o a las que quieren criopreservar sus óvulos antes de someterse a quimioterapias por padecimientos oncológicos.¹⁷

CONCLUSIONES

Los excelentes resultados de vitrificación demuestran las cualidades del programa de donación de óvulos congelados como una tecnología segura para establecer el banco de óvulos en las clínicas de reproducción asistida. El cultivo secuencial es una estrategia que debe considerarse para seleccionar embriones con un alto potencial de implantación. Deben realizarse más estudios para confirmar estos datos.

REFERENCIAS

- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, et al. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;54:102-108.
- Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod* 2005;20:3385-3389.
- 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.
- Latham KE, Schultz RM. Embryonic genome activation. *Front Biosci* 2001;6:D748-D759.

5. Artley JK, Braude PR, Johnson MH. Gene activity and cleavage arrest in human pre-embryos. *Hum Reprod* 1992;7(7):1014-1021.
6. Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage *versus* blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;17(4):CD002118. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(4):CD002118.
7. Quea G, Romero K, Garcia-Velasco JA. Extended embryo culture to increase implantation rate. *Reprod Biomed Online* 2007;14(3):375-383.
8. Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, Lahloub TM, et al. Blastocyst culture and transfer: a step toward improved *in vitro* fertilization outcome. *Fertil Steril* 2002;77(1):114-118.
9. Hentemann M, Bertheussen K. New media for culture to blastocyst. *Fertil Steril* 2009;91(3):878-883.
10. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:300-308.
11. Gardner DK, Schoolcraft WB. *In vitro* culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D, editors. *Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond 1999*. Carnforth: Parthenon Press, 1999;p:167-179.
12. Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, et al. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80:223-224.
13. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005;11:608-614.
14. 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(6):1657-1664.
15. Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Wright G, et al. Human oocyte vitrification: *in-vivo* and *in-vitro* maturation outcomes. *Reprod Biomed Online* 2008;17(5):684-688.
16. Homburg R, Van der Veen F, Silber SJ. Oocyte vitrification-women's emancipation set in stone. *Fertil Steril* 2009;91(4 Suppl):1319-1320.
17. Cobo A, Domingo J, Pérez S, Crespo J, et al. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2008;10(5):268-273.
18. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995;346:137-140.
19. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000;40:110-116.
20. Vajta G, Lewis IM, Kuwayama M, Greve T, et al. Sterile application of the open pulled straw (OPS) vitrification method. *Cryo Letters* 1998;19:389-392.
21. Bielanski A, Hanniman A. Non-cross-contamination of bovine embryos with microbes using the PPS vitrification system (Abstract). *Reprod Fertil Dev* 2007;19:232.
22. Cubillos S, Cuneo S. *Fertil Steril* 2008;(Suppl.).
23. Cubillos S, Cuneo S. Desarrollo embrionario y tasas de embarazo con el uso del banco de óvulos (Cryodon®). *Rev Mex Reprod* 2009;2(1):30.