

Vitrificación en cryotop, técnica de alto rendimiento para la criopreservación de ovocitos humanos

Luis Arturo Ruvalcaba Castellón,* Martha Isolina García Amador,* José Medina Flores,* Edgar Quiróz Torres,* Rocío Martínez Armas*

RESUMEN

Introducción: la vitrificación de ovocitos asociada con la utilización de cryotop es uno de los mejores avances en la criopreservación de los últimos años.

Objetivo: describir la evolución de 1,191 ovocitos humanos propios y donados luego de vitrificación en cryotop, en un centro de reproducción asistida.

Material y método: se vitrificaron ovocitos maduros (MII) de 69 pacientes en ciclo de fertilización *in vitro* y de donantes en 87 ciclos de donación, de julio de 2004 a mayo de 2008 en el Instituto Mexicano de Infertilidad de Guadalajara. Los óvulos (MII) aspirados, previa separación de la acumulación, se sumergieron en la solución de equilibrio (etilenglicol al 7.5% y dimetilsulfóxido al 7.5%) durante 10 minutos y luego se trasladaron a la solución de vitrificación compuesta por etilenglicol 15%, dimetilsulfóxido 15% y sucrosa 0.5 M. Posteriormente, se depositaron sobre la superficie del cryotop cerca de la punta, y éste se sumergió directamente en nitrógeno líquido para colocar su cubierta protectora. Los ovocitos se descongelaron con solución descongelante (TS) y de lavado (WS1-2). Los supervivientes se microinyectaron por medio de microinyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). Se transfirieron embriones el día 2 de desarrollo.

Resultados: de los 1,191 ovocitos descongelados, 453 (38%) eran propios y 738 (62%) de donantes, con una supervivencia de 86.9 y 93.9%, respectivamente. Luego de la microinyección intracitoplásmica de espermatozoides fertilizaron 90% y en el día 2 dividió en 4 células 93.7%. Se lograron embarazos en 18/69 (27%) pacientes y 50/87 (58%) receptoras. Han nacido 56 bebés saludables.

Conclusión: la vitrificación es una técnica de alto rendimiento para la criopreservación de ovocitos humanos porque proporciona altos índices de supervivencia, fertilización, división embrionaria y embarazo.

Palabras clave: ovocitos, criopreservación, vitrificación, congelación, cryotop.

ABSTRACT

Background: The vitrification of oocytes associated to the use of cryotop is one of the best advances in cryopreservation in recent years.

Objective: To describe the evolution of 1,191 own and donated human oocytes after thawing by cryotop method in an assisted reproduction center.

Material and method: There were vitrified mature oocytes of 69 patients ongoing *in vitro* fertilization cycles and 87 donation cycles, since July 2004 to May 2008 at Instituto Mexicano de Infertilidad, IMI-Guadalajara. The aspired oocytes were separated from the cumulus and placed in equilibrating solution (ES) (ethylene glycol 7.5% and dimethyl sulfoxide 7.5%) during 10 minutes; then they were changed to vitrification solution (VS) (ethylene glycol 15%, dimethyl sulfoxide 15%, and sucrose 0.5 M). Afterwards, the oocytes were put on the surface of the cryotop, near the tip, and then submerged directly into liquid nitrogen, and the cover was fixed. They were thawed with thawing solution (TS) and washed in two steps with washing solution (WS). The surviving oocytes were microinjected (ICSI). The embryos were transferred on day 2 under ultrasound guide.

Results: There were thawed 1,191 oocytes, 453 (38%) own and 738 (62%) donated, with a survival rate of 86.9 and 93.9% respectively. After microinjection (ICSI) 90% fertilized and 93.7% divided into 4 cells on day 2. There have succeeded pregnancy in 18/69 (27%) of patients and 50/87 (58%) of recipients. There have been born 56 healthy babies.

Conclusion: Vitrification is a high performance technique for the cryopreservation of human oocytes, which provides high survival, fertilization, embryo division and pregnancy rates.

Key words: vitrification, oocyte, cryopreservation, freezing, cryotop.

* Instituto Mexicano de Infertilidad (IMI), Centro Médico Puerta de Hierro, Guadalajara, Jalisco, México.

Correspondencia: Dr. Luis A Ruvalcaba C. Correo electrónico: drlarc@hotmail.com

Recibido: septiembre, 2008. Aceptado: diciembre, 2008.

Este artículo debe citarse como: Ruvalcaba CLA, García AMI, Medina FJ, Quiróz TE, Martínez AR. Vitrificación en cryotop, técnica de alto rendimiento para la criopreservación de ovocitos humanos. Rev Mex Reprod 2009;1(3):96-101.

La versión completa de este artículo también está disponible en: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

En 1986¹ se reportó el primer embarazo a partir de un ovocito criopreservado por medio de congelación lenta y dimetilsulfóxido como crioprotector. Sin embargo, con el tiempo la técnica de congelación lenta convencional resultó en bajas tasas de supervivencia ovocitaria y embarazo,²⁻⁵ esto impulsó múltiples ensayos, modificando el tipo de crioprotector utilizado, el volumen o sus concentraciones,⁶⁻¹⁰ con el objetivo de alcanzar resultados verdaderamente alentadores.

La idea de vitrificar, o alcanzar un estado similar al vidrio, fue descrita por primera vez en 1860 y retomada por Luyet en 1937. Cincuenta años más tarde (1985), Rall y Fahy¹¹ la describieron como una alternativa potencial a la congelación lenta y consiste en solidificar una solución por enfriamiento rápido, lo que forma un estado vídrio por elevación extrema de su viscosidad. Trounson¹² fue el primero en sumergir un ovocito directamente en nitrógeno líquido, reportó supervivencia y fertilización aceptables, pero bajas tasas de clivaje.

Los procedimientos actuales de vitrificación exponen la célula a un volumen reducido de crioprotectores a elevadas concentraciones por periodos muy breves, seguidos de congelación rápida en nitrógeno líquido. 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 ni de provocar daño a los organelos intracelulares,¹³ y así se incrementa su potencial de supervivencia.

Varios autores han mencionado otros daños atribuibles a la célula derivados de las bajas temperaturas, uno de los más importantes son las alteraciones en la segregación de los cromosomas durante la meiosis II.¹⁴⁻¹⁶ Al respecto, la evidencia es aún insuficiente y un tanto controvertida porque 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.¹⁷⁻²⁰

Un programa efectivo de criopreservación de ovocitos resulta de gran ayuda a mujeres que, por razones médicas o personales, necesitan diferir la posibilidad de embarazo por amenaza de pérdida de la función ovárica, por padecer alguna enfermedad oncológica que requiera quimioterapia o radioterapia o por restricciones ético-

religiosas que limiten la criopreservación de embriones. Entre sus beneficios más laxos podemos mencionar: permite preservar los ovocitos excedentes de ciclos de hiperestimulación en técnicas de reproducción asistida y facilita a los centros de reproducción la posibilidad de un banco de óvulos eficiente.

OBJETIVO

A pesar de los beneficios reconocidos para la técnica de vitrificación, la evidencia reportada aún resulta insuficiente.²¹ Este estudio tiene por objetivo dar a conocer la evolución de más de 1,000 ovocitos humanos propios y donados luego de su vitrificación en cryotop en un centro de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio descriptivo, observacional, realizado en el Instituto Mexicano de Infertilidad, de julio de 2004 a mayo de 2008. Se vitrificaron los ovocitos propios excedentes de 69 pacientes en 149 ciclos de fertilización *in vitro* y 87 ciclos de donantes.

Hiperestimulación ovárica

Se estimuló el ovario con recombinantes o menopropinas el día 2 o 3 del ciclo menstrual. Se aplicó antagonista del GnRH cuando al menos dos folículos alcanzaron 14 mm de diámetro. Se administraron 10,000 UI de hCG cuando dos o más folículos alcanzaron 18 mm de diámetro. Los ovocitos fueron aspirados 36 horas después y colocados en medio de cultivo Upgraded B2 INRA (CCD) previamente gasificado, durante 18 horas en promedio a 37 °C y 5% de CO₂ donde permanecieron, en promedio, dos horas. En seguida se separaron de la acumulación. Se identificaron los ovocitos en metafase II por la extrusión del primer cuerpo polar y se vitrificaron.

Técnica de vitrificación

Una vez separados de la acumulación los ovocitos metafase II fueron:

1. Depositados en la primera gota de un plato de cultivo que contenía tres gotas de solución de 30 µL. La primera de solución de lavado y las otras de solución de equilibrio, se hicieron puentes entre

ellas con la pipeta Pasteur en dos ocasiones, cada tres minutos.

2. Se trasladaron a la solución de equilibrio donde permanecieron 10 minutos.
3. Después se depositaron en la solución de vitrificación durante un minuto.
4. En ésta se aspiraron, se devolvieron con pipeta unas tres veces y se depositaron sobre la superficie del cryotop (Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japón). El cryotop consiste en una lámina muy delgada de polipropileno de 0.4 mm de ancho x 20 mm de largo x 0.1 mm de espesor, con una cubierta protectora, también plástica (3 cm de longitud), figura 1.

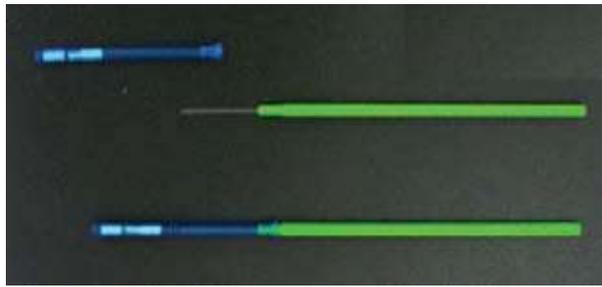


Figura 1. Cryotop.

5. El cryotop se sumergió rápida y directamente en un recipiente con nitrógeno líquido para la colocación de su cubierta protectora (figuras 2 y 3).

Estos dos últimos pasos son decisivos, ya que deben efectuarse en un minuto, quien los realiza debe dominar perfectamente el volumen ideal de solución y tener la habilidad de colocar los ovocitos sobre la superficie del cryotop.



Figura 2. El cryotop se sumerge directamente en el recipiente con N_2 líquido.

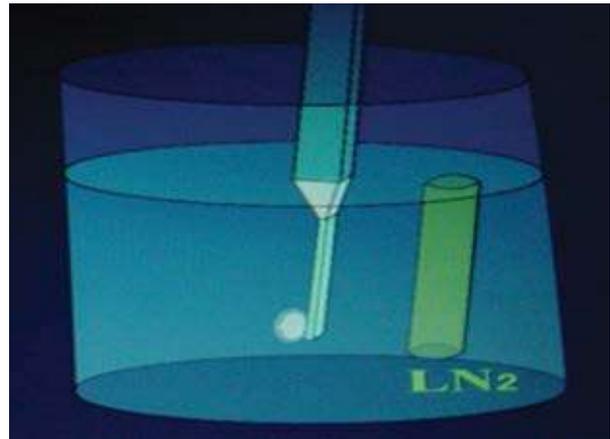


Figura 3. Colocación de la cubierta protectora.

Descongelación

1. Los ovocitos se depositaron en solución descongelante durante un minuto.
2. Luego se sumergieron en una solución diluyente durante tres minutos.
3. Se trasladaron a la solución de lavado dos veces, cinco minutos cada vez.
4. Los ovocitos supervivientes se dejaron en el medio de cultivo de 2 a 4 horas y posteriormente fueron microinyectados mediante la técnica convencional de microinyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI).

El equipo de soluciones utilizadas en la técnica es de Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japón.

Transferencia embrionaria

Los embriones se transfirieron a las pacientes y receptoras el día 2 de desarrollo, bajo guía ecográfica con ultrasonido marca Aloka SSD500. En el ciclo de preparación endometrial se utilizó agonista del GnRH para la supresión hipofisaria en las mujeres con función ovárica y estradiol en dosis progresivas: se inició con 2 mg los primeros ocho días del ciclo de preparación, 2 mg cada 12 horas los días 9, 10 y 11 y 2 mg cada ocho horas a partir del día 12. Para el soporte lúteo se administró progesterona en perlas de 200 mg el día de la descongelación de los ovocitos en horas de la tarde y se administró cada 12 horas hasta el día de la transferencia de los embriones. El día de la transferencia embrionaria se incrementó la dosis a 200 mg por vía oral cada ocho

horas, y se incluyó progesterona en ampollitas de 50 mg, una dosis diaria por vía intramuscular. En promedio, el estrógeno y la progesterona se mantuvieron hasta la semana 8 de gestación.

Análisis: Utilizamos estadística descriptiva, cuadros de frecuencia y porcentaje, medidas de tendencia central y dispersión.

RESULTADOS

Se descongelaron 1,191 ovocitos obtenidos de 69 pacientes en 149 ciclos de fertilización *in vitro* (ovocitos propios) y 87 ciclos de donación. Se descongelaron 453 ovocitos propios y 738 donados con una supervivencia de 87 y 94%, respectivamente. Fertilizaron después de la microinyección intracitoplásmica de espermatozoides 341/390 (87.4%) propios y 638/689 (92.6%) donados. Dividieron en cuatro células el día 2 de desarrollo 921 embriones (93.7%), cuadro 1.

Cuadro 1. Evolución de los ovocitos vitrificados según su origen

Ovocitos	Propios n (%)	Donados n (%)	Global n (%)
Descongelados	453 (38)	738 (62.0)	1,191 (100)
Supervivientes	390 (86.9)	689 (93.9)	1,079 (90.4)
Fertilizados	341 (87.4)	638 (92.6)	979 (90.0)
Divididos	316 (92.6)	605 (94.8)	921 (93.7)

Instituto Mexicano de Infertilidad, 2004-2008.

La edad promedio fue de 34 ± 3.8 años en las pacientes y de 40 ± 5.3 años en las receptoras. Se transfirieron 316 embriones a 69 pacientes en 87 ciclos y 605 a 87 receptoras en 149 ciclos; se obtuvieron 18/69 (26.1%) y 50/87 (57.5%) embarazos, respectivamente (cuadro 2).

Han nacido 56 bebés, producto de 36 gestaciones únicas y 10 dobles. Todos saludables a excepción de una niña, hija de madre diabética de 42 años de edad que sufrió una comunicación interventricular. De los nacidos vivos, 15/56 (27%) pertenecen al grupo de los ovocitos propios y 41/56 (73%) al de los ovocitos donados.

Trece embarazos no llegaron a término, entre ellos un embarazo ectópico cornual. No hubo ninguna pérdida

Cuadro 2. Generalidades y proporción de embarazo en pacientes y receptoras, ovocitos propios y donados

	Propios n	Donados n
Pacientes	69	87
Ciclos	87	149
Edad promedio	34 ± 3.8	40 ± 5.3
Embriones transferidos	316	605
Embarazos/ciclos	18/87 (20.6%)	50/149 (33.5%)
Embarazos/paciente	18/69 (26.1%)	50/87 (57.5%)
Nacidos vivos	15	41
Abortos	-	13 (19%)*

Instituto Mexicano de Infertilidad, 2004-2008.

* Un embarazo ectópico cornual.

en el grupo de las pacientes embarazadas a partir de ovocitos propios.

DISCUSIÓN

La vitrificación conjuga altas concentraciones de crioprotectores en mínimo volumen y elevadas velocidades de congelación ($15,000-30,000$ °C/min),²² lo que impide la formación de cristales de hielo durante los procesos de congelación-descongelación,²³ permite una mejor conservación de la ultraestructura y menor daño en la fisiología ovocitaria.²⁴ Boriniy col. han señalado que protocolos subóptimos para la criopreservación de ovocitos pueden causar daño subletal asociado con habilidad limitada para la fertilización;²⁵ nosotros observamos que, en forma proporcional, la mejor supervivencia corresponde con mejores tasas de fertilización y clivaje.

En este estudio reportamos tasas de supervivencia, fertilización y clivaje comparables con las reportadas por otros autores para la vitrificación de ovocitos humanos, independientemente del dispositivo utilizado para el depósito final de los ovocitos: cryotop, cryotip, cryoloop, cryoleaf, etc.²⁶⁻³⁰

La proporción de embarazo es similar a la reportada para ciclos en fresco, de forma indistinta para cuando transferimos embriones obtenidos a partir de ovocitos propios o donados vitrificados. Hasta ahora, los nacidos reportados para la vitrificación de ovocitos parecían tener una incidencia de anomalías congénitas (2.5%)³¹ no mayor a la reportada para los nacidos de embarazos espontáneos en mujeres fértiles, o en mujeres infértiles

en ciclos frescos de fertilización *in vitro*.³² En nuestra serie de nacidos vivos (56), reportamos una comunicación interventricular en una bebé hija de madre diabética, dato que corresponde a 1.78% de los casos y que muy probablemente no tenga relación con la técnica.

No hemos realizado diagnóstico genético preimplantatorio en nuestros embriones; sin embargo, consideramos que la proporción de nacidos saludables reportada sustenta la inocuidad de la técnica.

CONCLUSIÓN

La vitrificación de ovocitos humanos en cryotop es una técnica de congelación que proporciona elevada supervivencia ovocitaria, fertilización, clivaje y embarazo. Es una técnica sencilla y altamente reproducible, que al momento ha reportado una proporción de nacidos vivos saludables capaz de sustentar sus ventajas e inocuidad.

REFERENCIAS

- Chen C. Pregnancy after human oocytes cryopreservation. *Lancet* 1986;11:884-6.
- 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, et al. Cryopreservation of human oocyte. *Hum Reprod* 1987;2:695-700.
- Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB. Clinical application of human eggs cryopreservation. *Hum Reprod* 1998;13:3156-9.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, et al. Human oocyte cryopreservation: new perspective regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16:411-6.
- Stachecki JJ, Cohen J, Willadsen SM. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology* 1998;37:346-54.
- 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;17:3149-52.
- Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, et al. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:33-37.
- Borini A, Sciajino R, Bianchi V, Sereni E, et al. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2006;21(2):512-7.
- Shee-Huan Chen, Yih-Ron Lien, Hsin-Fu Chen, Li-Jung Yang, et al. 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):1975-80.
- Rall WF, Fahy GM. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-5.
- 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):1078-83.
- Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 2007;2:207-16.
- 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;54:102-8.
- 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;75:769-77.
- 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;17:1885-91.
- 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;19:655-9.
- 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;75:354-60.
- 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):350-9.
- Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, et al. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999;72:142-6.
- 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;124:483-9.
- 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 Exp Obstet Gynecol* 2003;30:125-9.
- Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, et al. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology* 2007;67:64-72.
- Borini A, Antonietta Bonu M, Coticchio G, Bianchi V, et al. Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2004;82:601-5.
- Katayama, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High

- survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80(1):223-4.
27. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 2003;18(2):384-91.
 28. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod BioMed Online* 2005;11:300-8.
 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 KY. Vitrified oocytes produce excellent pregnancy rate. *Fertil Steril* 2006;86(2):126-7.
 31. 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):608-10.
 32. Tan SL, Doyle P, Campbell S, Beral V, et al. Obstetric outcome of *in vitro* fertilization pregnancies compared with normally conceived pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:778-84.