

Primer nacido vivo en México luego de transferencia de embrión único obtenido a partir de cigotos vitrificados. Comunicación del caso

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

RESUMEN

Paciente de 29 años de edad, con esterilidad primaria de cinco años de evolución, con índice de masa corporal de 18.7 kg/m², en primer ciclo de FIVTE. La estimulación ovárica se realizó con 2,450 UI de menotropinas. Se administró el antagonista del GnRh en el día 9 del ciclo. Se efectuó la inducción final de la maduración ovocitaria con 10,000 UI de hCG el día 12 del ciclo y la aspiración de los ovocitos 36 horas después. Se obtuvieron 26 ovocitos, 23 en metafase II. No se transfirieron en fresco por datos de hiperestimulación. Se vitrificaron 13 óvulos y se microinyectaron 10. De los ovocitos microinyectados fertilizaron 7, y se vitrificaron en cryotops distintos 3 cigotos y 3 embriones en cuatro células. Los tres cigotos se desvitrificaron dos meses después. Sobrevivió uno. Se realizó la transferencia del embrión a la cavidad uterina el día 2 de desarrollo (4 células, 5% de fragmentos, 2 de simetría), bajo guía ecográfica transvaginal. Dos semanas después se reportó una prueba de gonadotropina coriónica (hCG) en sangre positiva. Se confirmó el embarazo en la sexta semana de gestación por la presencia de latido cardíaco. En mayo de 2007, a las 37.5 semanas de gestación, nació por cesárea una bebé saludable de 3,300 gramos de peso, Apgar 8/9 a uno y cinco minutos del nacimiento, respectivamente. La vitrificación de cigotos es un estado alternativo de criopreservación que en algunos casos puede resultar conveniente. Deberán realizarse estudios prospectivos para sustentar sus beneficios.

Palabras clave: cigotos, vitrificación, criopreservación.

ABSTRACT

A 29-year-old patient diagnosed with primary infertility and a body mass index (BMI) of 18.7 kg/m² underwent her first *in vitro* fertilization cycle. Ovarian stimulation was achieved with a total FSH dose of 2,450 IU. GnRh antagonist was started on day 9. Ovum pick-up was performed 36 hours following ovulation induction with hCG 10,000 IU, on day 12 of the cycle. A total of 26 oocytes were retrieved, from which 23 were mature (metaphase II). A total of 13 oocytes were vitrified and 10 underwent ICSI, from which seven were fertilized. Embryo transfer was delayed due to signs of ovarian hyperstimulation syndrome and fertilized embryos were vitrified in different stages (3 zygotes and 3 four-stage cell embryos). Vitrification was performed with the cryotop method. Two months following initial stimulation, zygotes were thawed, but only one survived. A single embryo transfer was performed under transvaginal ultrasound guidance on day two of embryo development (four cell, 5% fragments). A positive pregnancy test in blood was confirmed two weeks following embryo transfer and a single sac and fetal heartbeat identified on week six. On May 2007, a healthy female baby was born following cesarean section at 37.5 weeks. Birth weight was 3,300 grams, one and five minute Apgar 8/9, respectively. Zygote vitrification is an alternative stage for embryo cryopreservation, which in some cases might be the best option in cryopreservation. Still, prospective studies should be started in order to fully assess its potential benefits.

Key words: zygotes, vitrification, cryopreservation.

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

Correspondencia: Dra. Martha I García A. Correo electrónico: mgarciaamador@yahoo.com

Recibido: octubre, 2008. Aceptado: diciembre, 2008.

Este artículo debe citarse como: García AMI, Chávez BA, Medina FJ, Quiróz TE y col. Primer nacido vivo en México luego de transferencia de embrión único obtenido a partir de cigotos vitrificados. Comunicación del caso. Rev Mex Reprod 2009;1(3):109-12.

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

La vitrificación es una técnica útil para la criopreservación de tejidos, ovocitos, cigotos y blastocistos, entre otros, con tasas de recuperación exitosas. La vitrificación en pronúcleos es uno de los mejores estados para la criopreservación al comparar los resultados. Se reporta la recuperación de 100%¹ con alentadoras tasas de clivaje, implantación y embarazo.^{2,3} Es un estado alternativo de criopreservación para los países donde la regulación prohíbe la congelación de embriones en estado de clivaje.⁴

CASO CLÍNICO

Paciente de 29 años de edad, con esterilidad primaria de cinco años, peso: 56 kg, talla: 1.73 m, IMC de 18.7; en primer ciclo de fertilización *in vitro*. Fue estimulada con 2,450 UI de FSHu. Se inició el antagonista el día 9 del ciclo. Se administraron 10,000 UI de hCG el día 12 del ciclo. La aspiración ovular se realizó 36 horas después. Se obtuvieron 26 ovocitos. Los ovocitos capturados se colocaron en medio de cultivo Upgraded B2 INRA (CCD) previamente gasificado (por 18 horas en promedio a 37 °C y 5% de CO₂), durante un periodo de 2 horas. Luego de decumulados, se identificaron 23 ovocitos maduros. No se realizó transferencia en fresco por datos clínicos de hiperestimulación; así pues, 10 ovocitos se microinyectaron en fresco y 13 se destinaron a vitrificación. De los ovocitos microinyectados en fresco fertilizaron 7, y se vitrificaron 3 en estado de dos pronúcleos en un cryotop, y 3 embriones en 4 células (día 2) en otro (figura 1).

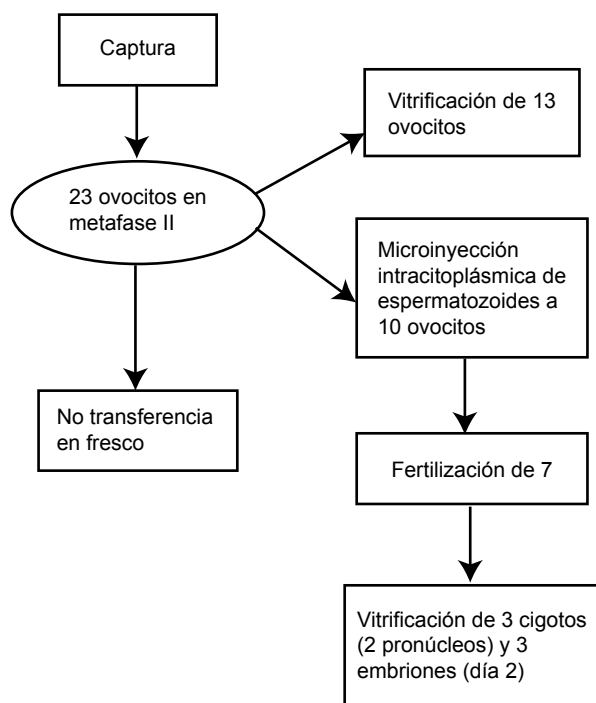


Figura 1. Descripción del flujo ovocitario posterior a la aspiración de los folículos.

El proceso de vitrificación para todos los estadios (ovocitos, cigotos y embriones) se llevó a cabo de la siguiente forma: 1) Se depositaron en la solución de equilibrio compuesta por etilenglicol y dimetilsulfóxido, ambos al 7.5%. 2) Se trasladaron a la solución de vitrificación compuesta por etilenglicol, 15%; dimetilsulfóxido, 15%; y sucrosa, 0.5 M; en ésta se aspiraron y se devolvieron con pipeta unas tres veces en un minuto. 3) Se colocaron en la superficie del cryotop (Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japón). 4) El cryotop se sumergió bruscamente en un recipiente con nitrógeno líquido para la colocación de su cubierta protectora. 5) Se depositó en el tanque de almacenamiento.

Para la descongelación de los cigotos, se utilizó solución descongelante (TS-sucrosa 1 M), solución diluyente (DS-sucrosa 0.5 M) y solución de lavado en dos pasos (WS1, WS2, Kit vitrificación-Kitazato). Una vez descongelados, los cigotos se colocaron en medio de cultivo Upgraded B2 INRA (CCD), previamente gasificado, donde evolucionaron al estado de cuatro células. El estado de los cigotos, antes y después del procedimiento de vitrificación, puede observarse en las figuras 2 y 3.

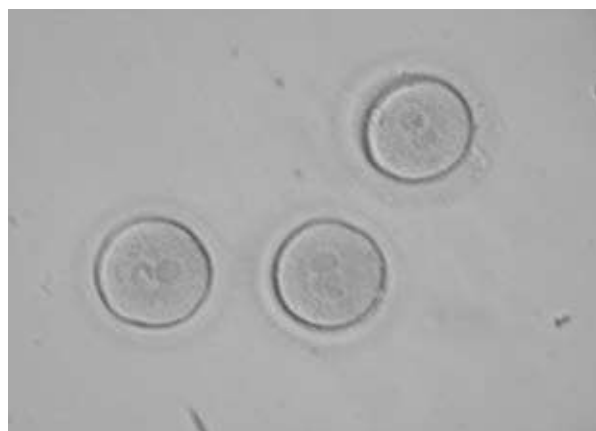


Figura 2. Cigotos en fresco.

Tres cigotos se descongelaron dos meses después de su vitrificación. Sobrevivió uno. Dos días después se transfirió a la cavidad un embrión (4 células, 5% de fragmentos, 2 de simetría), bajo guía ecográfica transvaginal con cánula de Kitazato.



Figura 3. Cigotos postvitrificación.

La transferencia embrionaria se realizó en el ciclo posterior de preparación endometrial con estradiol vía oral, 2 mg diarios los primeros ocho días; cada 12 horas los días 9, 10 y 11; y cada 8 horas a partir del día 12. Se administró progesterona en perlas de 200 mg, 24 horas antes de la descongelación de los cigotos; y 50 mg diarios por vía intramuscular a partir del día de la transferencia embrionaria. El resultado de la subunidad beta de hCG en el día 14 posterior a la transferencia embrionaria fue de 129 mUI/mL y de 320 mUI/mL a las 48 horas.

RESULTADOS

Se confirmó la presencia de un saco gestacional en la semana 5 y latido cardíaco a las 6.3 semanas de gestación. En la semana 37.5 de gestación nació por cesárea una bebé saludable, con peso de 3,300 gramos y Apgar 8/9; sin malformaciones congénitas.

DISCUSIÓN

El proceso de fecundación comprende una serie de eventos que comienzan por la fusión del ovocito con el espermatozoide, que lleva a la aparición de dos pronúcleos situados juntos, 12 y 16 horas después de la inseminación y que tienden a desaparecer a las 20-22 horas después de la misma.

La vitrificación se basa en la congelación de una mezcla de crioprotectores que, a bajas temperaturas, aumentan su viscosidad y forman un vidrio “sin formación de hielo”.⁵

Vitrificar en estado de pronúcleos permite la fecundación del ovocito en fresco, obviando así la posibilidad potencial de daño al huso meiótico por efecto de las bajas temperaturas, ya que cada vez más estudios sustentan que el riesgo de daño es bajo porque el huso normalmente desaparece durante la congelación y se reestructura después de la descongelación y el cultivo.⁶⁻⁸

Cuando hay cigotos excedentes conviene seleccionar el o los cigotos a vitrificar o a evolucionar. La selección puede llevarse a cabo siguiendo los parámetros de calidad establecidos,⁹⁻¹¹ cuya aplicación ha demostrado una buena correlación entre calidad del cigoto y posibilidad de implantación; sin embargo, para el caso que se comunica no tuvimos la posibilidad de seleccionar los cigotos a vitrificar. La indicación para el procedimiento no fue solamente el excedente en fresco, sino la existencia de datos de hiperestimulación que hacían inconveniente la transferencia embrionaria en fresco.

CONCLUSIÓN

El reporte del primer embarazo en México a partir de cigotos vitrificados refuerza la utilidad de la técnica de vitrificación para la criopreservación exitosa de diferentes estructuras biológicas.

Vitrificar en estado de pronúcleos es una forma alternativa de criopreservación embrionaria, que en casos específicos puede resultar conveniente.

REFERENCIAS

1. Kuwayama M, Teramoto S, Osada H, Hata K, Kato O. Clinical efficiency of vitrification of human embryos. Abstract (P-399) of the 20th Annual Meeting of the ESHRE 2004. Berlín, Alemania.
2. Selman HA, El-Danasouri I. Pregnancies derived from vitrified human zygotes. *Fertil Steril* 2002;77:422-3.
3. Park SP, Kim EY, Oh JH, Nam HK, et al. Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum Reprod* 2000;15:1787-90.
4. Orifefa Y, Nikolettos N, AL-Hassanic S. Cryopreservation of two pronuclear stage zygotes. *Reviews in Gynaecological Practice* 2005;5:39-44.
5. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984;21:407-26.
6. Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WI. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum Reprod*

- 1994;9:684-91.
7. Rienzi L, Martínez F, Ubaldi F, 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.
 8. Bianchi V, Coticchio G, Fava L, Flamigni C, Borini A. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2005;20(4):1078-83.
 9. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998;13:1003-13.
 10. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999;14:1318-23.
 11. Kattera S, Chen C. Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation. *Hum Reprod* 2004;19:294-9.