



Embarazo clínico: resultado de la fecundación *in vitro* convencional como método de inseminación de ovocitos desvitrificados

Israel Maldonado,* Jessica Lazcano,* Pablo López,* Alexandra Bermúdez,* Jacobo Dabbah,* Daniel Moreno,* Francisco J Cedillo,* Saúl Ruiz,* José Eligio Gaytán Melicoff*

RESUMEN

Diferentes reportes en todo el mundo y la propia experiencia han demostrado que la vitrificación con el método Cryotop ha sido –en términos de supervivencia, fertilización, división embrionaria, embarazo, etc.– la alternativa más exitosa de criopreservación de ovocitos humanos, utilizando la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) como único método de inseminación. Este artículo comunica los primeros resultados de un proyecto diseñado para establecer la técnica de fecundación *in vitro* convencional como un método más natural de inseminación de ovocitos humanos desvitrificados en pacientes cuya calidad espermática es adecuada y para tratar de disminuir en la medida de lo posible el excesivo uso de la microinyección intracitoplasmática en los ciclos en los que no resulta necesaria.

Palabras clave: fertilización *in vitro*, ovocitos desvitrificados, Cryotop.

ABSTRACT

Different reports throughout the world and our own experience have demonstrated that the vitrification technology by the cryotop method as an alternative for the cryopreservation of human oocytes has been successful, in terms of survival, fertilization, embryo development, pregnancy, etc., using ICSI as the unique method for thawed oocyte insemination. This article reports the first results of a project designed to implement the conventional IVF in those patients whose sperm quality does not make necessary the application of the ICSI method for insemination and to try to reduce, as much as possible, the excessive use of intracytoplasmic microinjection in cycles where it is not necessary.

Key words: *in vitro* fertilization, devitrified oocytes, cryotop.

Diferentes reportes en el mundo entero y la propia experiencia han demostrado que la vitrificación con el método Cryotop ha sido –en términos de supervivencia, fertilización, división embrionaria, embarazo, etc.– la alternativa más exitosa de criopreservación de ovocitos humanos utilizando la inyección intracitoplasmática de espermatozoides como único método de inseminación.^{1,2}

Cuando se utilizan sistemas de vitrificación tan eficientes como el Cryotop, el endurecimiento de la zona pelúcida y la exocitosis de los gránulos corticales son procesos que no se observan después de la desvitrificación en ovocitos de bovino.³ Con base en lo anterior, se ha diseñado este proyecto para establecer la técnica de fecundación *in vitro* convencional como un método más natural de inseminación de ovocitos humanos desvitrificados en pacientes cuya calidad espermática es adecuada y para tratar de disminuir en la medida de lo posible el excesivo uso de la microinyección intracitoplasmática en los ciclos en los que no resulta necesaria.

Los programas de donación de ovocitos humanos son una herramienta muy exitosa como alternativa de las tecnologías de reproducción asistida,⁴ dado que los ovocitos provienen generalmente de mujeres jóvenes con fertilidad probada. Los resultados conseguidos han sido tan excepcionalmente sorprendentes que han contribuido

* Instituto Mexicano de Alta Tecnología Reproductiva (INMATER), México, DF.

Correspondencia: Dr. Israel Maldonado. Correo electrónico: imaldonado@inmater.com.mx
Recibido: noviembre, 2009. Aceptado: diciembre, 2009.

Este artículo debe citarse como: Maldonado I, Lazcano J, López P y col. Embarazo clínico: resultado de la fecundación *in vitro* convencional como método de inseminación de ovocitos desvitrificados. Rev Mex Reprod 2010;2(3):84-87.

al incremento de indicaciones para esta opción terapéutica en pacientes infértiles, como: mujeres jóvenes con insuficiencia ovárica prematura, de edad avanzada, mujeres que con sus propios ovocitos han tenido múltiples fallos en los tratamientos de reproducción asistida, que padecen trastornos genéticos hereditarios, etc.⁵⁻⁷

El éxito tecnológico de la vitrificación de ovocitos con el método Cryotop, aplicado en muchas clínicas en todo el mundo, ha propiciado en gran medida la creación de múltiples bancos de gametos femeninos, que simplifican la coordinación entre donadoras y receptoras y que tienen, en comparación con los ciclos en fresco, las mismas posibilidades de éxito; además, la disminución de los costos y de los tiempos de espera de las receptoras es otro beneficio que se obtiene con los programas de criodonación.

Desde que se consiguió el primer embarazo mediante ovocitos criopreservados,⁸ se han desarrollado múltiples sistemas de criopreservación, como la vitrificación. Dicha tecnología de criopreservación por vitrificación tiene como principio enfriar ultrarrápidamente, por breves periodos, las células con agentes crioprotectores (permeables e impermeables), como etilenglicol, 1,2 propanodiol y sucrosa, y con una inmersión inmediata y directa en nitrógeno líquido, que facilita el superenfriamiento de las células a velocidades de $-23,000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ si se usa un mínimo volumen ($0.1\text{ }\mu\text{L}$) de él; con esto se evita la formación de cristales de hielo en el interior de las células vivas y se favorece la formación de una sustancia vítrea que asegura la supervivencia de éstas en 96%.^{9,10} Después de la desvitrificación, la técnica de inseminación utilizada ha sido la microinyección intracitoplasmática (ICSI), que ha demostrado ser una herramienta eficiente, con tasas de fertilización que varían entre 75 y 80% y tasas de desarrollo embrionario, de gestación, de implantación y de aborto similares a las conseguidas con óvulos frescos.

Entre las diversas técnicas de vitrificación que existen en la actualidad, las principales diferencias son: el tiempo en que las células entran en contacto con los crioprotectores, el tipo de soporte en que las células son introducidas en el nitrógeno líquido (sistemas abiertos o cerrados) y la cantidad de volumen de vitrificación que acompaña a cada célula.¹¹ El éxito de la técnica Cryotop reside en su delgado filamento plástico, que puede soportar

un mínimo volumen de medio ($0.1\text{ }\mu\text{L}$) que acompaña a las células para su vitrificación, a diferencia de los demás soportes cerrados, cuyo volumen de medio que acompaña a las células es 10 veces mayor, lo que afecta la velocidad de disminución de la temperatura, así como la tasa de supervivencia, la viabilidad celular, la tasa de gestación y la implantación.

La tecnología de la vitrificación se ha originado y desarrollado en modelos animales, como roedores y bovinos. Para analizar los procesos reproductivos de los humanos, hay que estudiar los procesos reproductivos de los modelos bovinos porque representan muchas ventajas debido a que sus procesos son muy similares a los procesos humanos en términos de ciclos reproductivos, vías endocrinas, tamaño de los ovarios y de los ovocitos, activación genómica embrionaria, desarrollo de un solo folículo preovulatorio por ciclo, etcétera.¹²

Durante los primeros procesos de criopreservación de ovocitos de mamíferos se supo que la tasa de supervivencia de ovocitos de ratón no varía si dichos ovocitos exhiben o no células del cúmulo durante la criopreservación.¹³

En un estudio publicado en 2004 –en el que se realizaron inseminaciones de ovocitos de bovino madurados *in vitro*, decumulados y, posteriormente, vitrificados y desvitrificados– la tasa de fertilización y de desarrollo embrionario tuvo efectos benéficos, pero la tasa de gestación, de implantación y de aborto no se reportó; además, en el estudio se sugirió que las células de la granulosa no son necesarias para fertilizar y que la mejor forma para vitrificar ovocitos es, sin duda, no incluyendo las células de la granulosa; también se demostró que el endurecimiento de la zona pelúcida y la reacción cortical no ocurren cuando el sistema de criopreservación es eficiente.³

CASO CLÍNICO

Dieciséis ovocitos, obtenidos en metafase II (observación tras decumulación) y provenientes de una mujer joven de 26 años de edad, fueron vitrificados con Cryotop Kitazato como soporte y almacenados en el banco de ovocitos. En una mezcla de gotas se equilibraron todos los ovocitos: $50\text{ }\mu\text{L}$ de solución de lavado + $50\text{ }\mu\text{L}$ de etilenglicol a 7.5% + solución de equilibrio de 1,2

propanediol a 7.5% durante seis minutos; posteriormente, fueron colocados durante nueve minutos en una gota de 50 μ L de solución de equilibrio sin diluir; después fueron colocados en solución de etilenglicol a 15% + 15% de 1,2 propanediol + 0.5 M de sucrosa (solución de vitrificación) por un minuto como máximo; después fueron colocados en el Cryotop con 0.5 μ L de solución de vitrificación e inmediatamente fueron sumergidos en nitrógeno líquido. Ocho ovocitos, tres meses después de su criopreservación, fueron desvitrificados y donados a una receptora de 40 años. La desvitrificación se realizó así: los ovocitos se colocaron en una solución de 1 M de sucrosa (solución de desvitrificación) a 37 °C durante 40 segundos, luego en 0.5 M de sucrosa (solución diluyente) por tres minutos y, finalmente, en dos soluciones de lavado durante cinco minutos, respectivamente.

Todos los óvulos con citoplasma refringente e intacto se consideraron vivos. Los ocho ovocitos desvitrificados se inseminaron, 30 minutos después de la desvitrificación, por fecundación *in vitro* convencional con semen de la pareja de la receptora.

La calidad seminal del varón reportó una concentración de 45 mill/mL, una movilidad A + B de 48% y una morfología espermática normal de 3%.

Dos embriones en ocho células con 5% de fragmentación se transfirieron a la receptora en el día 3 de desarrollo; no hubo complicación alguna durante la transferencia.

Después de evaluar las tasas de supervivencia, fecundación, desarrollo embrionario y gestación, se obtuvo una supervivencia ovocitaria de 100% (8 de 8), una tasa de fertilización normal de 62% (5 de 8), un porcentaje de división en el día 2 de 100%, una media de blastómeras en el día 2 de 3 ± 1 , una media de fragmentación de $6\% \pm 2.23$, una tasa de división en el día 3 de 80% (4 de 5), una media de blastómeras en el día 3 de 6.75 ± 1.5 y una media de fragmentación en el día 3 de $7\% \pm 4.47$.

La gestación clínica fue obtenida y no se vitrificaron embriones.

DISCUSIÓN

Después de analizar en otra receptora (observaciones aún no publicadas) un primer ciclo en nuestra clínica

de donación de ovocitos desvitrificados e inseminados mediante las técnicas de fecundación *in vitro* convencional (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la tasa de fertilización fue menor que la derivada de la técnica de ICSI; sin embargo, la calidad de los embriones producidos por FIV convencional fue muy similar a la de los embriones producidos por ICSI. Si en el programa de donación de ovocitos desvitrificados se toma en cuenta que los resultados de ICSI generan tasas de éxito comparables con las reportadas en la bibliografía,¹⁴⁻¹⁶ entonces puede decirse que la técnica de FIV convencional de ovocitos desvitrificados genera embarazos clínicos; se cree que puede aumentarse la tasa de fertilización –que hasta ahora se ha conseguido– con solamente aumentar la concentración espermática, ya que en el ciclo previo, y también en éste, la concentración utilizada fue relativamente baja a propósito debido a la medida que nos generó la posibilidad de polispermia, pues no se contó con las células de la granulosa durante la FIV. Al considerar que se está partiendo de datos muy escasos en términos de número de ovocitos y que los embriones que se produjeron por FIV convencional se desarrollaron como los embriones producidos por ICSI y, además, generaron embarazo, puede suponerse que si se logra mejorar la tasa de fecundación por FIV convencional, dicha tecnología podrá ser utilizada por los embriólogos como alternativa de rutina a la ICSI, en los ciclos de desvitrificación de ovocitos en los que la calidad espermática así lo permita.

Debido a que este trabajo es el primero en su tipo y a que la información existente en la bibliografía es nula, es necesario seguir analizando más casos para confirmar y mejorar estos incipientes resultados.

REFERENCIAS

1. Cobo A, Kuwayama M, Perez S, et al. *In-vitro* and clinical evaluation of oocytes vitrification for egg donation programs. Lyon: Scientific programme Overview, 2004.
2. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007;1:73-80.
3. Chian R, Kuwayama M, Tan L, et al. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *J Reprod Dev* 2004;50:685-696.
4. Glujovsky D, Pesce R, Fisz bajn G, et al. Endometrial pre-

- paration for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocytes. Cochrane Database Syst Rev 2010;1:CD006359.
5. Rosenwaks Z. Donor eggs: Their application in modern reproductive technologies. Fertil Steril 1987;47:895-909.
6. Sauer M, Paulson R, Lobo R. Pregnancy after age 50: application of oocyte donation to women after natural menopause. Lancet 1993;341:321-323.
7. Remohi J, Vidal A, Pellicer A. Oocyte donation in low responders to conventional ovarian stimulation for *in vitro* fertilization. Fertil Steril 1993;59:1208-1215.
8. Chen C. Pregnancy after human cryopreservation. Lancet 1986;1:884-886.
9. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. Theriogenology 2007;67:73-80.
10. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reproductive Biomed Online 2005;11:300-308.
11. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Reproductive Biomed Online 2005;11:608-614.
12. Shaw J, Oranratnacha A, Trouson A. Fundamental cryobiology of human mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology 2000;53:59-72.
13. Imoedemhe D, Sique A. Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cummulus in 1,2 propanediol. J Assist Reprod Genet 1992;9:323-327.
14. Ruvalcaba L, Martínez R, Cuneo S, et al. Improving donor programs with an oocyte bank using vitrification. Fertil Steril 2005;84(Suppl. 1):S70.
15. Cobo A, Bellver J, Domingo J, et al. New options in assisted reproduction technology: the cryotop method of oocyte vitrification. Reproductive Biomed Online 2008;17:68-72.
16. Antinori M, Licata E, Dani G, et al. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. Reproductive Biomed Online 2007;14:72-79.