



Embarazos exitosos tras vitrificación de ovocitos y embriones

Francisco Hernández Salazar,* Erik Omar Okhuysen Loza,** María Teresa Huerta J Lucas,* Gustavo Romero Gutiérrez*

Nivel de evidencia: III

RESUMEN

La criopreservación de ovocitos humanos es una solución al conflicto ético que representa el almacenamiento de embriones congelados para pacientes en riesgo de sufrir síndrome de hiperestimulación ovárica; también es una técnica viable para preservar la fertilidad de mujeres con cáncer que deban recibir tratamiento radio o quimioterapéutico, que sufren de insuficiencia y envejecimiento ovárico prematuro, cuyas condiciones médicas y sociales hagan necesario postergar la maternidad o aquellas que sean pobres respondedoras, así como para facilitar programas de donación de óvulos. Se comunican dos casos de vitrificación de óvulos y embriones realizada en el Centro de Fertilidad y Reproducción Humana PRONACER, Hospital Aranda de la Parra, León, Guanajuato, México, y sus resultados. La vitrificación con el método de Cryotop es una excelente alternativa, eficiente, rápida y económica para la criopreservación ovular y embrionaria, ya que se vincula con altas tasas de fertilización, clivaje embrionario y evolución normal de los embarazos.

Palabras clave: vitrificación, criopreservación, óvulos, embriones.

ABSTRACT

Cryopreservation of human oocytes represents a solution for ethic conflict about frozen embryo storage for patients with risk to develop ovarian hyperstimulation syndrome; also is an available technique to preserve fertility in women with cancer under treatment, in poor response patients, in case of premature ovarian failure or aging and for other medical or social conditions that require to delay pregnancies, as well as to make easier oocyte donation programs. This paper reports two cases of successful pregnancies after embryo and oocyte vitrification, as well as their results. The technique of vitrification with the cryotop method is an excellent alternative, efficient, fast and cheap for oocyte and embryo cryopreservation with high ranges of fertilization, cleavage and pregnancies with a normal evolution.

Key words: vitrification, cryopreservation, oocytes, embryos.

RÉSUMÉ

La cryoconservation d'ovocytes humains est une solution au conflit éthique que représente le stockage d'embryons congelés pour des patientes en risque de souffrir syndrome d'hyperstimulation ovarienne ; elle est aussi une technique viable pour préserver la fertilité de femmes qui doivent recevoir traitement radio ou chimiothérapeutique, qui souffrent d'insuffisance et vieillissement ovarien prématûr, dont les conditions médicales et sociales rendent nécessaire retarder la maternité ou celles qui soient de faibles répondeuses, ainsi que pour faciliter des programmes de donation d'ovules. On communique deux cas de vitrification d'ovules et embryons réalisée au Centre de Fertilité et Reproduction Humaine PRONACER, Hôpital Aranda de la Parra, León, Guanajuato, Mexique, et ses résultats. La vitrification avec la méthode Cryotop est une excellente alternative, efficace, rapide et économique pour la cryoconservation ovulaire et embryonnaire, car elle est liée avec de hauts taux de fertilisation, clivage embryonnaire et évolution normale des grossesses.

Mots-clés : vitrification, cryoconservation, ovules, embryons.

RESUMO

A criopreservação de ovócitos humanos é uma solução de conflito ético que representa o armazenamento de embriões congelados para pacientes em risco de sofrer síndrome de hiperestimulação ovariana; também é uma técnica viável para preservar a fertilidade de mulheres com câncer que devem receber tratamento radioterápico ou quimioterápico, que sofrem de insuficiência e envelhecimento ovariano prematuro, cujas condições médicas e sociáveis seja necessário postergar a maternidade ou aquelas que sejam pobres respondedoras, assim como para facilitar programas de doação de óvulos. Se estabelecem dois casos de vitrificação de óvulos e embrões realizada no Centro de Fertilidade e Reprodução Humana PRONACER, Hospital Aranda da Parra, León, Guanajuato, México, e seus resultados. A vitrificação, clivagem embrionária e a evolução normal das gestações.

Palavras-chave: vitrificação, criopreservação, óvulos, embrões.

La criopreservación de ovocitos humanos es una solución al conflicto ético que representa el almacenamiento de embriones congelados para pacientes en riesgo de padecer síndrome de hiperestimulación ovárica;¹ es también una técnica viable para preservar la fertilidad de mujeres con cáncer que deban recibir tratamiento radio o quimioterapéutico, para las que sufren de insuficiencia y envejecimiento ovárico prematuro o cuyas condiciones médicas y sociales hagan necesario postergar la maternidad, o incluso para las pobres respondedoras, así como para fomentar programas de donación de óvulos.²

El ovocito, por sus características estructurales y fisiológicas, tiende a dañarse cuando se intenta criopreservarlo; experimenta cambios principalmente en la zona pelúcida, tales como liberación prematura del contenido de los gránulos corticales, fracturas, rotura de la membrana plasmática, desorganización extensiva del ooplasma, endurecimiento y daño en el citoesqueleto, ya que el eje meiótico es extremadamente sensible al enfriamiento y se reduce hasta desaparecer, esto origina la dispersión de los cromosomas.^{2,3}

La vitrificación es un método de criopreservación en el que se enfrián las soluciones a altas velocidades para solidificarlas sin que se formen cristales de hielo; esto minimiza los inconvenientes de la congelación, puesto que los procesos de deshidratación y penetración del crioprotector ocurren antes. El enfriamiento se realiza en un solo paso a una velocidad aproximada de -23,000 °C/min;⁴ el calentamiento es más rápido (12,000 °C/min). La técnica de Cryotop⁵ reduce el choque osmótico, la toxicidad del crioprotector y los daños

causados por el enfriamiento, al tiempo que aumenta el rango de supervivencia y la tasa de embarazo.⁵⁻⁷

A partir de la implantación del protocolo de vitrificación ovocitaria como procedimiento de rutina en algunos centros, se ha reportado un incremento en los embarazos exitosos.⁸⁻¹⁰ Se han publicado artículos sobre la vitrificación de ovocitos de otros mamíferos.¹⁰

El objetivo de este estudio es indagar si la vitrificación es una mejor alternativa al método de congelación lenta utilizado tradicionalmente y analizar la vitrificación de embriones y ovocitos con resultados positivos.

CASOS CLÍNICOS

Se comunica el caso de una paciente de 23 años de edad a la que se le realizó estimulación ovárica controlada con hormona folículo estimulante recombinante indicada para inseminación artificial, en la ciudad de Morelia. El ginecoobstetra la refirió a este centro para que se le ofreciera una alternativa de atención, ya que mostraba hiperestimulación ovárica con 20 folículos mayores a 18 mm. La paciente dio su consentimiento informado a la fertilización *in vitro* y a la donación altruista de ovocitos. Se le administró una dosis de 10,000 UI de gonadotropina coriónica humana 36 horas antes de la aspiración de ovocitos guiada con ultrasonido.¹¹

Se recolectaron 20 ovocitos, que al ser denudados con hialuronidasa dieron 13 en metafase II. De éstos, cinco se destinaron a la paciente portadora para fertilización *in vitro* convencional; cinco a la receptora 1, que en ese momento se fecundaron por medio de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y los embriones resultantes se vitrificaron 24 horas después o en un estadio de cuatro células, y los tres ovocitos restantes se destinaron a la receptora 2, que se sometieron a la técnica de vitrificación con volumen mínimo de crioprotector (MVC) (Cryotop, Kitazato, Co.), para ser desvitrificados, inyectados y transferidos a las 24 horas de la fecundación.

Receptora 1

La paciente designada como receptora 1 tenía 40 años de edad y sufrió infertilidad por factor masculino. Su preparación endometrial se hizo con valerianato de

* Médico ginecoobstetra.

** Jefe del laboratorio de reproducción.

Centro de Fertilidad y Reproducción Humana PRONACER, Hospital Aranda de la Parra, León, Guanajuato, México.

Correspondencia: Dr. Francisco Hernández Salazar. Hospital Aranda de la Parra, calle Hidalgo núm. 333, 2^o piso, Centro, CP 37200, León, Guanajuato, México. Tels.: 01477- 716-1910 y 01-477-636-7454, fax: 01-477-716-1929.

E-mail: dr.francisco_hernandez@pronacer.com, dr.francisco.hernandez@gmail.com

Recibido: mayo, 2007. Aceptado: noviembre, 2007.

Este artículo debe citarse como: Hernández SF, Okhuyzen LEO, Huerta JLMT, Romero GG. Embarazos exitosos tras vitrificación de ovocitos y embriones. Ginecol Obstet Mex 2008;76(2):113-7. La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.actualizacionmedica.com.mx

estradiol a dosis de 2 mg durante los días primero a octavo del ciclo, se incrementó a 4 mg del noveno al undécimo día y aumentó a 6 mg a partir del duodécimo; dos días antes de la transferencia embrionaria se le administró progesterona por vía vaginal a dosis de 200 mg. Después de la obtención de los ovocitos se realizaron los procesos de vitrificación, fecundación y clivaje embrionario, además de la desvitrificación el día de la transferencia.

Receptora 2

La receptora 2 era una mujer de 48 años de edad con problemas de infertilidad y en la menopausia, que recibió la misma preparación endometrial. Se hizo la vitrificación de ovocitos el día de la obtención, y la desvitrificación e inyección intracitoplasmática de espermatozoides de su esposo 48 horas antes de la transferencia embrionaria.

Vitrificación de embriones y ovocitos

La vitrificación se realizó con la técnica de Cryotop (Kuwayama, Kato, et al.) cuando los embriones estaban en un estadio de cuatro células, o 24 horas después de la fecundación, y cuando habían transcurrido seis horas como máximo de que se colectaron los ovocitos. Se introdujeron en una solución estabilizadora (15% de etilenglicol más dimetilsulfóxido) durante 10 minutos y luego se expusieron a la solución de vitrificación (Kitazato, Co.) consistente en 15% de etilenglicol, 15% de dimetilsulfóxido y 0.5 mmol/L de sucrosa; entonces se cargaron en un volumen mínimo de cultivo y se sumergieron de inmediato en nitrógeno líquido.

Desvitrificación, microinyección

Los ovocitos se desvitrificaron mediante un rápido calentamiento (12,000 °C/min), se colocaron un minuto en Thawing Solution (TS, Kitazato, Co.) con 1 µL de sucrosa a 37 °C, posteriormente se equilibraron en Dyluent Solution (DS, Kitazato, Co.) con 0.5 µL de sucrosa durante tres minutos a temperatura ambiente y se lavaron dos veces consecutivas con Washing Solution (WS, Kitazato, Co.). Después, se pusieron en un medio de cultivo (G-fert, Vitrolife) y se estabilizaron en ambiente de incubadora al 5% de CO₂ y 37 °C dos a cuatro horas antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Valoración de la fecundación, cultivo

Después de la microinyección, los ovocitos se dejaron en un medio de cultivo (G1, Vitrolife) en la incubadora y se valoraron luego de 15 a 18 horas para identificar la fecundación. A las 48 horas de la desvitrificación se transfirieron y se microinyectaron en un estadio de cuatro células.

Desvitrificación, transferencia

Los embriones obtenidos de la paciente donante, microinyectados con semen homólogo a la receptora y vitrificados siguiendo el procedimiento descrito, se desvitrificaron mediante el protocolo de calentamiento rápido cuatro horas antes de la transferencia intrauterina.

Transferencia embrionaria intrauterina

La transferencia embrionaria intrauterina se hizo en el laboratorio de reproducción. A continuación se describe el proceso: se coloca a la paciente en posición ginecológica y se le introduce un espejo vaginal para visualizar el cuello uterino; éste se limpia con solución fisiológica y una gasa estéril, y después se aspira el moco endocervical con un catéter intrauterino (usado en inseminaciones del set de Frydman, CCD PARIS). Con el auxilio de ultrasonograma abdominal (ultrasonido Aloka con transductor de 3.5 MHz) se observa el útero, específicamente el endometrio, y se mete un catéter de transferencia (set de Frydman) en la cavidad uterina. Antes de tocar el fondo, se retira la guía alámbrica del catéter y a través de él se introducen los embriones contenidos en una jeringa hipodérmica de 1 mL adherida a otro catéter. Los embriones están en medio de cultivo (embryogluje, Vitrolife, en una cantidad de 5 µL) con una burbuja de aire 4 mm antes de la punta del catéter, y se colocan 1 cm antes del fondo uterino. Se retira el catéter y se examina bajo microscopio estereoscópico para asegurarse de que todos los embriones quedaron en la cavidad uterina. Se deja a la paciente en posición de Trendelenburg durante una hora después de realizar la transferencia.

RESULTADOS

Donadora

Para esta paciente se usaron cinco óvulos en metafase II, de los cuales se fecundaron cuatro y tres

mostraron divisiones de grado uno; estos últimos se transfirieron en estadio de cuatro células. Se le dio soporte endometrial con progesterona por vía vaginal a dosis de 200 mg cada ocho horas. La prueba de embarazo fue positiva y se corroboró la existencia de un saco gestacional *in utero*. A las 36 semanas de gestación se le diagnosticó preeclampsia severa. El día 3 de junio de 2006 a las 17:20 horas dio a luz un varón que pesó 2,800 gramos y tuvo una calificación Apgar de 8-9.

Receptora 1

Se utilizaron cinco embriones grado 1 vitrificados en estadio de cuatro células y se desvitrificaron cuatro horas antes de la transferencia; todos se recuperaron por completo después del calentamiento. A la paciente se le administró progesterona por vía vaginal a dosis de 200 mg cada ocho horas y 8 mg de valerianato de estradiol oral al día. El 9 de agosto de 2006 nació por cesárea un recién nacido de 3,030 gramos de peso y calificación Apgar de 9-9.

Receptora 2

Para esta paciente se vitrificaron y calentaron tres ovocitos en metafase II, que tuvieron una supervivencia del 100% tres días antes de la transferencia. Se sometieron a inyección intracitoplasmática tres horas después de haber sido desvitrificados; los tres se fecundaron y dividieron. Al tercer día se transfirieron en estadio de cuatro células, grado 1. Se le proporcionó a la paciente soporte con progesterona vaginal a dosis de 200 mg cada ocho horas y 8 mg de valerianato de estradiol por vía oral al día. Se logró un embarazo gemelar de desarrollo normal. Mediante cesárea se obtuvieron dos niñas vivas y sanas; una de ellas de 2,000 gramos de peso y una calificación Apgar de 8-9; la otra pesó 2,150 gramos y tuvo valores Apgar de 8-9. Esta última permaneció dos días en incubadora, de la que fue dada de alta sin complicaciones.

DISCUSIÓN

Hoy en día, la vitrificación representa una excelente alternativa para pacientes jóvenes que quieren postergar la maternidad, que no cuentan con pareja y no quieren ver reducidas las posibilidades de

embarazo o incrementado el riesgo de sufrir alguna cromosomopatía a causa del envejecimiento; también para pacientes que tienen probabilidades de padecer síndrome de hiperestimulación ovárica o para aquellas que van a recibir tratamientos oncológicos, ya sea de radio o quimioterapia. De acuerdo con el reporte de casos de los autores, este procedimiento genera una excelente tasa de recuperación ovocitaria y de embriones posvitrificados, lo que coincide con la información contenida en otros estudios, que muestran que la vitrificación en estadio ovular, pronuclear o embrionario, es superior a la tradicional congelación lenta.

La vitrificación produce un endurecimiento de la zona pelúcida, motivo por el cual los óvulos vitrificados deben ser microinyectados (ICSI).⁴ En la criopreservación de ovocitos y embriones humanos mediante la vitrificación rápida se usa una escasa cantidad de solución, con lo que se evita la formación de cristales de hielo. En este estudio se decidió utilizar Cryotops, técnica que ha arrojado buenos resultados en otras investigaciones.³⁻¹⁰

La solución de vitrificación contiene etilenglicol, que es el elemento que induce mejoría en las tasas de recuperación ovocitaria, en comparación con el método tradicional, en el que se usaba el propanediol (PROH), como puede determinarse en reportes previos que revelan las diferencias estadísticamente significativas de estos dos crioprotectores.^{4,8}

Takahashi y colaboradores han encontrado tasas de embarazo similares después de la transferencia embrionaria en estadio de blastocisto, tanto en fresco como congelado. De acuerdo con sus hallazgos, la tasa de implantación es de 29% y la de embarazo de 44.1%, lo que es semejante a las cifras de transferencia de blastocistos en fresco: 23.4 y 44.4%, respectivamente.¹¹

CONCLUSIONES

La vitrificación es una herramienta muy útil que ha contribuido a los grandes adelantos del pasado siglo en materia de reproducción asistida. Gracias al perfeccionamiento de la técnica, hoy en día más parejas tienen la posibilidad de aumentar sus expectativas de embarazo.

Agradecimiento

Al Dr. Gustavo Romero Gutiérrez, médico ginecoobsteta e investigador, miembro del Comité Científico del Colegio de Ginecología y Obstetricia de León, por su valiosa asesoría.

REFERENCIAS

1. Kably A, Ruiz J, Sánchez A. Tratamiento del síndrome de hiperestimulación ovárica grave mediante paracentesis descompresiva y autotransfusión de líquido de ascitis. *Ginecol Obstet Mex* 2006;74:291-9.
2. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Gahimi G. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 2002;10:1095.
3. Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven, Reineke A, Harjte M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987;2:695-700.
4. Kuleshova L, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002;78:3,449-53.
5. Kuwayama M. Vitrification of human oocytes and embryos. *IVF Update*. Tokyo: Medical View Co., 2001;pp:230-4.
6. Katayama P, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 1998;68:994-57.
7. Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:583-605.
8. Lucena E, Bernal DP, Lucena C et al. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006;85(1):108-11.
9. 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;14:3077-9.
10. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T et al. Vitrification of human blastocyst using Cryoloops: Clinical outcomes of 223 cycles. *Hum Reprod* 2003;18(2):384-91.
11. Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using Cryoloop: a 4 year follow-up study. *Fertil Steril* 2005;84(1):88-92.