

Seguridad y viabilidad de la vitrificación en el banco de óvulos

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

RESUMEN

La vitrificación y el uso del banco de óvulos es una alternativa viable y segura para generar embriones para fines reproductivos en humanos. Es un excelente método para preservar la fertilidad de la mujer y disminuir el tiempo y costo de la donación de óvulos tradicional. El adecuado uso de las técnicas de la vitrificación y la buena selección de donantes y receptoras hace que el programa del banco de óvulos vitrificados (CRYODON®), sea una opción real de tratamiento en la donación de óvulos. La vitrificación de óvulos y su almacenaje, también es una excelente alternativa para preservar o posponer la maternidad en pacientes solteras, ejecutivas o previamente a ser sometidas a cirugías mutilantes o tratamientos oncológicos como la quimio y radioterapia.

Palabras clave: Vitrificación, banco de óvulos, vitrificación de ovocitos, blastocisto, donación de óvulos.

ABSTRACT

The vitrification process and the oocyte banking is a safe and reliable choice to generate embryos for human reproductive purposes. It is an excellent alternative to preserve the women fertility and lower the time and cost of the conventional oocyte donation. The careful use of the vitrification techniques and the good selection of donors and recipients, allows that the program of vitrified oocyte banking (CRYODON®), to be a reliable option of treatment for oocyte donation. The oocyte vitrification and its storage, it is also an excellent alternative to preserve or delay the motherhood in single and executive women or in patients previous to mutilate surgeries or oncologic treatments, such us radio or chemotherapy.

Key words: Vitrification, oocyte banking, oocyte vitrification, blastocyst, oocyte donation.

INTRODUCCIÓN

El banco de óvulos es la mejor opción no sólo para preservar la fertilidad de la mujer, si no 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 ella desea y evitar un 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, un sistema abierto de congelación, por los efectos que se puedan oca- sionar sobre el ovocito, como daño en el alineamiento de la cromatina (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 aquellos 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 transferen-

cia de embrión único, fallos de implantación, reducción en el número de embriones a transferir y a congelar.⁶⁻⁹ Nuestro objetivo fue mostrar que la vitrificación de óvulos y el cultivo secuencial de los embriones derivados de Ésta, son un método seguro y viable para el éxito del programa de CRYODON® (Banco de Óvulos Vitrificados).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: Estudio retrospectivo descriptivo, realizado en Concibe Reproducción Asistida, México, D.F. **Pacientes:** Treinta y un receptoras de ovocitos descongelados (CRYODON®). **Intervención:** vitrificación de óvulos por el método del cryotop. **Principales datos analizados y pruebas de investigación básicas:** tasas de embarazo, implantación y aborto. Como requisito para nuestro programa de donación de óvulos todas las donantes debían tener fertilidad comprobada *in vitro* o *in vivo* para poder ser incluidas como donantes en fresco o congeladas, ser menores de 30 años. Fueron estimuladas con protocolos en *down regulation*. Las receptoras empezaron la progesterona el día de la descongelación de los óvulos. Los óvulos de 30 donantes fueron vitrificados

* Laboratorio de Reproducción Asistida, S.A. de C.V. CONCIBE, Reproducción Asistida.

**Cuadro 1.** Características de las pacientes estudiadas.

Programa	Donantes	Receptoras
CRYODON		
Protocolo	Down regulation	C Sustituido
Número de ciclos	30	31
Edad	23.5	40.5
Media de óvulos aspirados/asignados		9.6
FRESCO		
Protocolo	Down regulation	CSustituido
Número de ciclos	33	48
Edad	22.9	40
Media de óvulos aspirados/ asignados		12.5

Cuadro 2. Resultado de Desvitrificación de Ovocitos.

			χ^2	Valor de <i>p</i>
Asignados (n)	600	310		
Tasa de sobre vivencia	NA	96.45%	299 de 310	0.459 < 0.06 NSD
Ovocitos inyectados/inseminados	600	299		
Tasa de fecundación	87.80%	527 de 600	85.29%	255 de 299 4.59 0.05 DS
Fecundación anormal	1.67%	10 de 600	4%	12 de 299
Ovocitos degenerados	3%	18 de 600	6.60%	20 de 299 6.7 0.05 DS

de mayo de 2006 a diciembre de 2007 y se descongelaron óvulos para 31 receptoras de junio de 2006 a junio de 2008. Adicionalmente 33 donantes de óvulos fueron aspiradas y asignadas en fresco en el momento a 48 receptoras de junio del 2007 a diciembre del 2007 (Cuadro 1).

Se vitrificó cada ovocito metafase II con la técnica del cryotop, con 15% de etilenglicol y 15% de propanediol y al desvitrificar se uso 0.5M de Sucrosa.¹⁰ En el programa de CRYODON® los ovocitos que sobrevivieron a la descongelación fueron inseminados por ICSI y en el programa tradicional por FIV e ICSI según el caso particular de la paciente. Los ovocitos fecundados (zigotos) fueron cultivados hasta el momento de la transferencia en día 5 o 6 según el desarrollo embrionario. El análisis estadístico se realizó con el software estadístico SPSS. Debido a que los datos no tienen una distribución normal la estadística no para métrica fue usada para comparar los ciclos en fresco con los congelados usando Mann Whitney U test. La χ^2 fue usada para las variables cuantitativas con una significancia de *p* < 0.05.

RESULTADOS

El número total de ovocitos frescos asignados fue de 600 y el de congelados fue de 310; la tasa de sobre vivencia

a la vitrificación fue de 96.45%, la de fecundación 85.29% sin encontrar ninguna diferencia significativa con el programa en fresco. En cuanto a la fecundación anormal 1.67% y el porcentaje de ovocitos degenerados 3.0% en el programa de CRYODON® si encontramos diferencias significativas (Cuadro 2).

En cuanto a la calidad embrionaria se evaluó el día 2, 3 y el blastocisto. El clivaje de día 2 fue de 93.33%, en día 3 fue de 77.31% sin encontrar diferencias significativas con el programa en fresco, el número de células en día 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 Nosotros encontramos esta tasa en 42.8%, con una tasa general de formación de blastocisto de 38.04%, la tasa de congelación de embriones fue de 18.57%, todas estas tasas en el programa de CRYODON® fueron estadísticamente significativas al compararlas con el programa en fresco (Cuadro 3).

El número de pacientes transferidas en fresco fue de 47 y 29 en CRYODON® con una media de embriones de 2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de embarazo, implantación, aborto, embarazo

Cuadro 3. Clivaje Embrionario.

Embriones	Donación fresco	Donación congelado		χ^2	Valor p		
Clivaje día 2	94.50%	498 de 527	93.30%	238 de 255	623.5	0.18	ND
# células día 2	3.9		3.6				
Clivaje día 3	80.30%	400 de 498	77.31%	184 de 238	578	0.09	ND
# células día 3	7.8		7.5				
Clivaje día 5	79.92%	219 de 274	59.37%	76 de 128	327.5	0.01	DS
Clivaje día 6	64.96%	178 de 274	54.68%	70 de 128	453.5	0.01	DS
Tasa de formación de Blastocisto	44.55%	178 de 400	38.04%	70 de 184	524.5	0.025	DS
Blastocistos de Buena calidad	60.60%	108 de 178	42.80%	30 de 70	6.45	0.05	DS
Embriones congelados	47.10%	84 de 178	18.57%	13 de 70	17.26	0.05	DS

Cuadro 4. Resultados clínicos.

Tasas	Donación fresco	Donación congelados		U de Mann Whitney	Valor p		
Tasa de embarazo	70.21%	33 de 47	65.50%	19 de 29	649.5	0.671	NSD
Tasa de implantación	36%	34 de 94	33.33%	19 de 57	624	0.457	NSD
Tasa de aborto	11.76%	4 de 34	21.05%	4 de 19	285.5	0.395	NSD
Tasa de transferidos	2.08%	1 de 48	6.45%	2 de 31	712.5	0.34	NSD
Tasa de embarazo múltiple	2.12%	1 de 47	6.89%	2 de 29	1.06	0.06	NSD
Número de pacientes							
Transferidas	47	47 de 48	29	29 de 31	37.94	0.82	NSD
Embriones Transferidos	94 (2.0)		54 (1.86)				

múltiple y no transferencia (Cuadro 4). La tasa general de embarazo e implantación en el programa de óvulos donados vitrificados fue de 65.50 y 33.33%, respectivamente.

DISCUSIÓN

Nosotros encontramos una tasa de sobrevivencia ovo-citaria post desvitrificación del 96.45%, una tasa de fecundación de 85.29% y una tasa de formación de blastocisto de 38.04% esto nos sugiere que después de la criopreservación por vitrificación los ovocitos mantiene su capacidad fecundante y metabólica, nuestros resultados muestran tasas similares a las reportadas previamente en cuanto a embarazo e implantación,¹²⁻¹⁴ no encontramos diferencias estadísticamente significativas con los datos del programa de donación en fresco; sin embargo, en el clivaje de día 5 y 6, tasa de formación de blastocis-

to, la buena calidad de blastocistos, y en el número de embriones revitrificados del programa de CRYODON® si hay diferencias estadísticamente significativas que podrían o no correlacionarse con un letargo importante en el desarrollo de estos embriones.

Datos publicados han sugerido el riesgo de reacciones cruzadas en el nitrógeno líquido.^{18,19} Una de las críticas hechas al cryotop por ser un sistema abierto es precisamente esto;²⁰⁻²² sin embargo, otros reportes han mostrado la seguridad del sistema y sus beneficios. Más datos deben publicarse para hacer reproducible estos reportes en beneficio de las bondades del sistema. En nuestros reportes preliminares hemos encontrado en las pruebas de investigación básica que brindan seguridad y viabilidad de la vitrificación en los óvulos y que no se genera daño de éstos y que la formación de embriones para fines reproductivos es segura.^{23,24}



En el futuro próximo, 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, también facilitará la criopreservación de óvulos a aquellas mujeres que quieren posponer su maternidad¹⁶ o aquéllas que tengan que criopreservar sus óvulos antes de someterse a quimioterapias por padecimientos oncológicos.¹⁷

CONCLUSIONES

Los excelentes resultados de vitrificación nos demuestran las bondades 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 a ser considerada para seleccionar embriones con un alto potencial de implantación. Más estudios debe realizarse para confirmar estos datos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CONACYT, que a través de su programa de Proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica en su modalidad INNOVAPYME colaboró para lograr este proyecto.

REFERENCIAS

1. 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.
2. 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: 3385-9.
3. Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, et al. Reprod Biomed Online 2008 16(5): 608-10. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes.
4. Latham KE, Schultz RM. Embryonic genome activation. *Front Biosci* 2001; 6: D748-59.
5. Artley JK, Braude PR, Johnson MH. Gene activity and cleavage arrest in human pre-embryos. *Hum Reprod* 1992; 7(7): 1014-21.
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): CD002118Cochrane 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): 375-83.
8. Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, Lahloub TM, Ibrahim MH. Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2002; 77(1): 114-8.
9. Hentemann M, Bertheussen K. New media for culture to blastocyst. *Fertil Steril* 2009; 91(3): 878-83.
10. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300-8.
11. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D (eds.). *Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond 1999*. Carnforth UK: Parthenon Press; 1999, p. 167-79.
12. Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 80: 223-4.
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: 608-14.
14. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008; 89(6): 1657-64.
15. Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Wright G, Kort HI, Nagy ZP. Human oocyte vitrification: in-vivo and in-vitro maturation outcomes. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(5): 684-8.
16. Homburg R, van der Veen F, Silber SJ. Oocyte vitrification—women's emancipation set in stone. *Fertil Steril* 2009; 91(4 Suppl.): 1319-20. Epub 2008 Apr 14.
17. Cobo A, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2008; 10(5): 268-73.
18. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346: 137-40.
19. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000; 40: 110-6.
20. Vajta G, Lewis IM, Kuwayama M, Greve T, Callesen H. Sterile application of the Open Pulled Straw (OPS) vitrification method. *Cryo Letters* 1998; 19: 389-92.
21. 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: 608-14.
22. Bielanski A, Hanniman A. Non-cross-contamination of bovine embryos with microbes using the PPS vitrification system (Abstract). *Reprod Fertil Dev* 2007; 19: 232.
23. Cubillos S, Cuneo S. *Fertil Steril* (Sup. Nov 2008).



24. Cubillos S, Cuneo S. Desarrollo embrionario y tasas de embarazo con el uso del banco de óvulos (Cryodón®). Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción 2009; 2(1): p. 30.

Av. Paseo de las Palmas 745-405

Col. Lomas de Chapultepec.

Del. Miguel Hidalgo

C.P. 1100, México, D.F.

Correo electrónico: scuneo@concibe.com.mx

Solicitud de sobretiros:

Dr. Silvio Cuneo Pareto