



Estudio clínico comparativo. Resultado de la vitrificación y desvitrificación de embriones humanos con dos tipos de sistemas abiertos: Cryotop vs Cryolock

Jessica Lazcano,* Israel Maldonado,* Pablo López,* Jacobo Dabbah,* Daniel Moreno,** Alexandra Bermúdez,** José Eligio Gaytán Melicoff*

RESUMEN

Antecedentes: en los últimos años en muchas clínicas de todo el mundo la vitrificación de embriones se ha convertido en una técnica de reproducción asistida de rutina diaria. Durante varios años se ha trabajado con el sistema abierto Cryotop, cuyas tasas de supervivencia y de embarazo son mayores de 90 y 60%, respectivamente. En la clínica se introduce ahora el sistema abierto Cryolock para realizar la vitrificación embrionaria en los días 3 y 5 de desarrollo.

Objetivos: comparar entre sí la efectividad del nuevo sistema abierto Cryolock y la del Cryotop y evaluar las tasas de supervivencia y de embarazo tras la desvitrificación y la transferencia.

Material y método: se analizaron retrospectivamente los procedimientos de descongelación y transferencia que se realizaron en nuestra clínica durante el año 2009.

Resultados: se observó que no hay diferencia significativa entre ambos métodos y que las tasas de supervivencia y de embarazo (90 y 60%) no varían usando el sistema abierto Cryolock.

Conclusiones: aun cuando el Cryotop tiene un filamento más delgado que el Cryolock, dicha diferencia no llega a afectar de manera significativa las tasas de supervivencia y de embarazo cuando los embriones son desvitrificados y transferidos a las pacientes. El uso del Cryolock es recomendable para la vitrificación embrionaria.

Palabras clave: vitrificación, desvitrificación, Cryotop, Cryolock.

ABSTRACT

Background: Through the past years embryo vitrification has become a daily basis therapeutical assisted reproductive technique in many countries worldwide. We have worked with Cryotop open system device for several years, yielding survival rates above 90% and pregnancy rates of 60%. Now we introduced to our clinic the Cryolock open system device for embryo vitrification on day 3 or 5 of development.

Objectives: To compare the effectiveness of the new open system Cryolock with Cryotop, and to assess the survival and pregnancy rates after devitrification and transfer.

Material and method: A retrospective analysis of the procedures of defrosting and transferring (done in our clinic during 2009) was performed.

Results: We found that there is no significant difference between them, and furthermore, Cryolock device yields as well optimum survival and pregnancy rates: 90% and 60%, respectively. Thus, we recommended Cryolock device for embryo vitrification.

Conclusions: Although Cryotop presents a thinner filament compared to Cryolock, such a difference does not significantly affect survival and pregnancy rates when they are devitrified and transferred to patients. The use of Cryolock is recommended to embryo vitrification.

Key words: vitrification, desvitrification, Cryotop, Cryolock.

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

** Departamento de Reproducción, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, DF.

Correspondencia: Dr. Jessica Lazcano. Correo electrónico: jlazcano@inmater.com.mx

Recibido: noviembre, 2009. Aceptado: enero, 2010.

Este artículo debe citarse como: Lazcano J, Maldonado I, López P y col. Estudio clínico comparativo. Resultado de la vitrificación y desvitrificación de embriones humanos con dos tipos de sistemas abiertos: Cryotop vs Cryolock. Rev Mex Reprod 2010;2(3):79-83.

Desde que en 1983 se logró el primer embarazo con transferencia de embriones descongelados,¹ la criopreservación de embriones humanos se ha convertido en una práctica indispensable para un laboratorio de reproducción asistida.^{2,3} En un principio la criopreservación lenta era la única alternativa existente para poder almacenar embriones.⁴ A pesar de que con esta técnica podían obtenerse tasas de supervivencia de 80%, el porcentaje de embarazo y la tasa de implantación eran

muy bajos (21 y 7%, respectivamente);⁵ esto se debía principalmente a que el embrión sufría daño durante la descongelación, cuyo principal detrimento era la formación de cristales.⁶ Además, había que tener un equipo costoso y mucho tiempo para poder realizar la congelación lenta.

El método de vitrificación, que se introdujo con el paso de los años y con el mejoramiento de las técnicas de reproducción asistida, es un método de ultracongelación que evita la formación de cristales, ya que no sólo disminuye potencialmente la temperatura, sino que además logra que un estado cristalino se convierta en estado vítreo.⁷ Aun cuando en algunos países todavía es una técnica experimental, la vitrificación es un procedimiento de rutina en muchas partes del mundo. Trajo consigo múltiples beneficios, entre los cuales el más importante es poder vitrificar ovocitos,^{8,9} con lo que la preservación de la fertilidad y la congelación de embriones, que en muchos países es muy restringida o está prohibida, están teniendo una nueva alternativa.

Uno de los inconvenientes de la técnica es que requiere altas concentraciones de crioprotectores, cuya toxicidad daña a los embriones.¹⁰ Para que la técnica sea efectiva, son indispensables la experiencia y la habilidad del embriólogo para poder garantizar la supervivencia, la viabilidad y la calidad del embrión.

Otro factor determinante en la supervivencia del embrión es el soporte que se utilice. Existen dos tipos de soportes principales: el abierto y el cerrado. En la práctica se utiliza el soporte abierto de Cryotop (Kitazato Ltd., Japón); sin embargo, en el último año se introdujo el Cryolock (Biodiseño Ltda). Aunque ambos soportes son muy similares entre sí, es importante determinar si el nuevo soporte (Cryolock) es capaz de sustentar resultados óptimos. La valoración del soporte es muy importante, ya que debe asegurarse la supervivencia y viabilidad del embrión.

Los objetivos de este trabajo son: 1) analizar retrospectivamente los procedimientos de descongelación y transferencia que se realizaron en nuestra clínica durante el año 2009, 2) comparar entre sí la efectividad del nuevo sistema abierto Cryolock y la del Cryotop y 3) evaluar las tasas de supervivencia y de embarazo tras la desvitrificación y la transferencia.

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio fue realizado en el Instituto Mexicano de Alta Tecnología Reproductiva (INMATER), en la Ciudad de México. Los resultados que se muestran se obtuvieron de los procedimientos de descongelación y transferencia embrionaria que se realizaron durante el año 2009. En total, 230 embriones fueron vitrificados y desvitrificados y 157 fueron transferidos en el día 3 o 5 de desarrollo. Los embriones no transferidos fueron revitrificados y almacenados en el banco de la clínica. Del total, 121 embriones fueron vitrificados con el sistema abierto Cryotop (representando 43 ciclos), y 109, con el Cryolock (representando 44 ciclos).

Los embriones se distribuyeron en dos grupos de trabajo. El grupo A era el de los embriones desvitrificados y transferidos en el día 3 de desarrollo, y el B, el de los embriones desvitrificados y transferidos en el día 5 de desarrollo.

Soluciones de vitrificación

Todos los embriones fueron vitrificados de acuerdo con el método de Kuwayama.¹¹

Las soluciones de vitrificación fueron las siguientes: solución de lavado HEPES suplementada con suero sustituto a 20% y solución de equilibrio preparada con 7.5% (v/v) de etilenglicol (Sigma) + 7.5% (v/v) de 1,2 propanediol (Sigma); la solución de vitrificación se preparó con 15% (v/v) de etilenglicol + 15% de propanediol + 0.5 M de sucrosa (Sigma); la solución de desvitrificación se preparó a una concentración de 1 M de sucrosa en HEPES, y la solución diluyente, a 0.5 M en HEPES.

Vitrificación

Todos los embriones fueron equilibrados durante 15 minutos en solución de etilenglicol; posteriormente, durante 45 segundos —como máximo— se sumergieron en solución de vitrificación, se tomaron con poca solución de vitrificación y se cargaron en el Cryotop o Cryolock; inmediatamente, éste se sumergió en nitrógeno líquido (N₂L) para almacenarlo hasta el día de la transferencia. Para la desvitrificación, el Cryotop o Cryolock se sumergió por un minuto en solución de desvitrificación a 37 °C, luego se colocó durante tres minutos en solución

diluyente y, finalmente, se lavó por 10 minutos en solución de lavado. Los embriones se transfirieron media hora después de ser desvitrificados.

Preparación endometrial

A las pacientes se les suministró, una semana antes de su ciclo menstrual, un depósito de antagonista de 3.75 mg (Lectrum) por vía intramuscular; luego se realizó un ultrasonido para descartar la existencia de quistes. En el tercer día de su periodo las pacientes se aplicaron, cada tres días, dos parches epidérmicos Evorel de 50 mg y, en la tercera aplicación, incrementaron la dosis a cuatro parches. El día 5 o 6 del periodo se realizó, mediante un ultrasonido, un seguimiento endometrial y una lectura de las concentraciones de estradiol. Si el endometrio tenía un grosor mayor o igual a 6 mm y si estaba trilaminar, se fijó la fecha de transferencia y se le indicó a la paciente utilizar óvulos vaginales (Utrogestan) a partir del día de su ovulación. Doce días después de la transferencia embrionaria se determinó la concentración de gonadotropina coriónica humana y se confirmó el embarazo tras detectar un latido cardíaco a las siete semanas de gestación.

RESULTADOS

Como se muestra en el cuadro 1, los resultados indican que el Cryolock es un soporte que tiene, al igual que el Cryotop, una buena tasa de supervivencia (92%) tras la desvitrificación y no muestra una diferencia significativa entre los embriones desvitrificados y transferidos en el día 3 de desarrollo y los del día 5.

Las tasas de embarazo son equiparables con las de ciclos realizados en fresco (observaciones no publicadas), lo cual indica que la desvitrificación no altera la viabilidad del embrión en ambos grupos.

DISCUSIÓN

Aunque en la mayor parte de las clínicas de reproducción asistida del mundo se realiza el método de vitrificación, aún existen discrepancias acerca de su uso, por la posibilidad de una contaminación cruzada al utilizar soportes abiertos o por el daño embrionario causado por la alta concentración de crioprotectores utilizados. Sin embargo, esta técnica –entre otras muchas ventajas– también representa una disminución de costos para la paciente, porque con un solo ciclo de estimulación se pueden asegurar múltiples transferencias de embriones descongelados. Gracias a las técnicas de reproducción asistida los embarazos y los nacimientos múltiples han aumentado en los últimos 25 años.¹² Los embarazos múltiples constituyen un alto riesgo para las madres porque aumentan las posibilidades de preeclampsia, labor de parto prematuro, hipertensión y diabetes.¹³ La capacidad de almacenar embriones disminuye la posible obtención de embarazos múltiples, ya que el número de embriones por transferir se reduce.¹⁴ También la transferencia de embriones desvitrificados se ha aplicado con éxito en ciclos naturales de ovulación espontánea y en ciclos de ovulación estimulada artificialmente.¹⁵ La preparación endometrial de la madre receptora es mucho más sencilla para una transferencia de embriones descongelados

Cuadro 1. Comparación de vitrificación de embriones, en los días 3 y 5 de desarrollo, con soporte abierto Cryotop o Cryolock

	DT en el día 3 de desarrollo		χ^2	DT en el día 5 de desarrollo		χ^2
	Cryotop	Cryolock		Cryotop	Cryolock	
Ciclos totales	20	23	ND	23	21	ND
Embriones desvitrificados	54	70	ND	67	39	ND
Porcentaje de supervivencia tras la desvitrificación	90.74 $\pm$ 1.02	92.8 $\pm$ 1.2	p = 0.79	92.54 $\pm$ 1.5	92.3 $\pm$ 0.56	p = 0.78
Embriones transferidos	37	50	p = 0.087	38	32	p = 0.45
Media de embriones transferidos	1.85 $\pm$ 0.58	2.1 $\pm$ 0.65	ND	1.65 $\pm$ 0.57	1.5 $\pm$ 0.53	ND
Porcentaje de embarazo	60 (12/20)	56.5 (13/23)	p = 0.77	65.2 (15/23)	66.6 (14/21)	p = 0.88

DT: descongelación y transferencia; ND: no determinado; análisis estadístico de χ^2 , realizado con el programa GraphPad Software, en el que el valor de $p \leq 1$ no es significativo.

que para una punción folicular; además, en caso de que la paciente tenga algún contratiempo –como una hiperestimulación–,¹⁶ tiene la garantía de conservar sus embriones hasta estar en condiciones adecuadas para la transferencia.

En nuestra clínica se realizan transferencias embrionarias en el día 3 o 5 de desarrollo sin que haya diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, en un cultivo de embriones extendido hasta la fase de blastocisto es bien sabido que los embriones con desarrollo anormal se desechan, lo que disminuye, en parte, el riesgo de transferir embriones con anomalías cromosómicas.^{17,18} La transferencia embrionaria en el día 5 de desarrollo requiere un laboratorio bien capacitado en las técnicas de cultivo secuencial y en la valoración embrionaria hasta la fase de blastocisto; aunque en estas etapas las condiciones de cultivo son más críticas y requieren una supervisión más cuidadosa, un laboratorio con un control de calidad adecuado es capaz de sostener la viabilidad del embrión hasta el día 5 o 6 de cultivo.

Otro punto a favor es que, generalmente, los embriones de mejor calidad para la transferencia se seleccionan durante el ciclo en fresco y los otros embriones se dejan para su consecuente observación y vitrificación.¹⁹ En general, los embriones vitrificados son de igual o menor calidad que los transferidos en fresco. En nuestra experiencia clínica la tasa de embarazo con embriones descongelados es igual o, incluso, mayor que con embriones transferidos en fresco, lo que indica que la calidad del embrión vitrificado no se ve afectada durante la desvitrificación.

En cuanto al efecto en la morfología y al detrimento del embrión durante la desvitrificación, no se obtuvo ningún resultado significativo cuando se compararon ambos soportes de criopreservación. Pocos embriones tuvieron daños en las blastómeras cuando fueron desvitrificados (observaciones no publicadas).

CONCLUSIONES

Aun cuando estos resultados demuestran que el Cryotop tiene un filamento más delgado que el Cryolock, dicha diferencia no llega a afectar de manera significativa las tasas de supervivencia y de embarazo cuando los em-

briones son desvitrificados y transferidos a las pacientes; por tanto, en la actualidad el sistema abierto sigue siendo más exitoso que otros sistemas de criopreservación y, mejor aún, la tasa de embarazo en nuestra experiencia ha aumentado en comparación con las transferencias de ciclos en fresco.

Queda por analizar el comportamiento del Cryolock en ovocitos vitrificados.

REFERENCIAS

1. Trouson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305:707-709.
2. Varghese A, Peter Z, Agarwall A. Current trends, biological foundations and future prospects of oocyte and embryo cryopreservation. *Reprod Biomed* 2009;19:126-140.
3. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci* 1972;11:1071-1079.
4. Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002;78(3):449-454.
5. Rezazadeh M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, et al. Vitrification *versus* slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:347-354.
6. Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, et al. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology* 1996;33:459-464.
7. Rall W, Fgy G. Ice free-cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.
8. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, et al. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum Reprod* 1999;14:3077-3079.
9. Liebermann 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;124:483-489.
10. Fahy GM, Levy DI, Ali SE. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* 1987;24:196-213.
11. 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.
12. Cutting R, Morroll D, Roberts SA, et al. Elective single embryo transfer: guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Hum Fertil* 2008;11:131-146.
13. Tallo CP, Vohr B, Oh W, et al. Maternal and neonatal morbidity associated with *in vitro* fertilization. *J Pediatr* 1995;127:794-800.
14. Ertzeid G, Fedorcsak P, Abyholm T, et al. Elective single embryo transfer in assisted reproduction. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2006;126(23):3101-3102.

15. Al-Shawaf T, Yang D, Al-Magid Y, et al. Infertility: Ultrasonic monitoring during replacement of frozen/thawed embryos in natural and hormone replacement cycles. *Hum Reprod* 1993;8:2068-2074.
16. Tarek A, Gelbaya MD, Luciano G, et al. Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled cycles: A retrospective study. *Fertil Steril* 2006;85:603-609.
17. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: A prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004;19:849-858.
18. Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update. *Reprod Biomed Online* 2009;19:4328.
19. Check JH, Summers-Chase D, Swenson K, et al. A comparison of survival, pregnancy, and implantation rates after transfer of frozen thawed embryos according to the cell stage at time of cryopreservation-possible influence of selection. *Reprod Technol* 2002;10:1-5.