

# Vitrificación de ovocitos: Primer embarazo evolutivo en Argentina utilizando esta técnica

Sabrina De Vincentiis; Santiago Brugo Olmedo.

SEREMAS, Medicina para el Hombre y la Mujer.

Reproducción 2009;24:20-24

### Introducción

La criopreservación de ovocitos lleva una larga historia de casi 30 años, alternando entre el éxito y el fracaso.

El primer trabajo exitoso sobre la congelación de ovocitos se reportó en 1977 en ratones<sup>1</sup>, pero el interés se perdió rápidamente ya que en 1978 se daba a conocer el nacimiento del primer bebé "de probeta" y en 1983 se producían los primeros nacimientos provenientes de embriones humanos congelados/descongelados.<sup>2,3</sup>

La criopreservación de embriones siempre estuvo rodeada de cuestiones éticas, morales y religiosas, y por ello nuevamente en 1986 se vuelve la mirada a la congelación de ovocitos, la cual hasta ese momento sólo se realizaba de manera limitada y en ratones. Esta técnica, ya sea por los procedimientos convencionales de congelación lenta o por vitrificación, se realiza desde hace varios años en el mundo y con excelentes resultados. De hecho, en nuestro país la vitrificación de embriones se utiliza en muchos centros de fertilidad y los resultados se publicaron varias veces en las comunidades científicas. Hasta hace poco el desafío eran los óvulos.

La vitrificación exitosa de óvulos humanos se desarrolló recientemente y permite conservarlos a 196°C bajo cero con una altísima probabilidad de supervivencia. Hasta entonces solamente se podía realizar la clásica técnica de congelamiento lento, pero más de la mitad de los óvulos no resistían el procedimiento, lo que la transformaba en altamente ineficiente. Si bien la técnica de vitrificación de óvulos en el área de la veterinaria existe desde 1972, en

humanos no daba buenos resultados. Pero las modificaciones realizadas recientemente al procedimiento son las que permiten referirse a ella como una nueva técnica para conservar óvulos exitosamente.

### Caso clínico

La paciente, de 36 años de edad, consultó por esterilidad primaria de 6 años de evolución. Sin antecedentes médicos de interés, su perfil hormonal plasmático mostró repetidos niveles de FSH por encima de lo normal. El resto de las hormonas se informaron como normales.

Se indicó fertilización *in vitro* con inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) debido a un factor masculino severo (OAT severa) posiblemente derivado de una criptorquidia unilateral, descendida quirúrgicamente a los 6 años de edad.

Teniendo en cuenta su perfil de baja respondedora, la estimulación ovárica que se realizó en febrero de 2008, se inició el segundo día del ciclo con 450 unidades de FSH recombinante (Gonal F) y se agregó un antagonista de GnRH (Cetrotide) los últimos tres días de la estimulación. Se descargó la ovulación con hCG (Ovidrel) y se efectuó la punción folicular (17 de febrero de 2008) bajo sedación y anestesia local a las 35 horas.

En la aspiración folicular se obtuvieron 6 ovocitos, 5 de los cuales fueron clasificados como Metafase II y 1 Profase I. Sin embargo, el endometrio no mostró signos de buen crecimiento sin lograrse un espesor mayor de 5 mm, por lo que se decidió vitrificar los 5 ovocitos Metafase II obtenidos y hacer la inyección de los mismos y la transferencia de los futuros embriones más adelante.

---

**Correspondencia:** Sabrina De Vincentiis  
E-mail: [sdv@seremas.com](mailto:sdv@seremas.com)

Además, se congeló la muestra del varón ya que los pacientes eran del interior del país y se prefirió trabajar con la muestra congelada al momento de realizar la ICSI con los ovocitos vitrificados.

Cinco meses después se procedió a la preparación del endometrio de la paciente con 4 mg de  $17\beta$  estradiol (Ronfase) desde el segundo día de su ciclo. Una vez que se consiguió un endometrio de 9 mm (12 días después de iniciados los estrógenos) se desvitrificaron los óvulos y se procedió a realizar la inyección de los espermatozoides (ICSI). Ese día se

aumentó la dosis de  $17\beta$  estradiol a 6 mg diarios.

Luego de la descongelación, 4 de los ovocitos sobrevivieron (80% de sobrevivida) (Figuras 1 y 2). Además, se descongeló la muestra de semen del varón y se la procesó para ser utilizada en el ICSI. Tres ovocitos fertilizaron normalmente y uno de ellos no lo hizo.

Una vez fertilizados los óvulos, se inició la administración de progesterona por vía vaginal (Crinone) todas las noches.

**Figura 1.** 4 ovocitos descongelados luego de la vitrificación

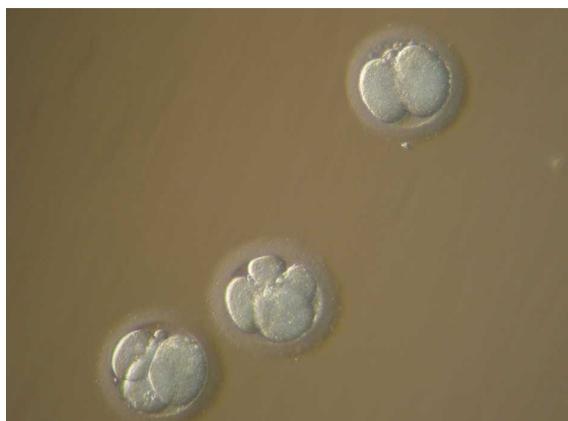


**Figura 2.** Ovocito magnificado que sobrevive a la descongelación.



An advertisement for Seremas. The background is a close-up, black and white photograph of a woman's eye, looking slightly to the side. The eye is partially covered by a white fabric, possibly a surgical mask or a piece of clothing. In the top right corner, there is a logo consisting of a stylized human figure with arms raised, above the text "Seremas" and "Medicina para el hombre y la mujer". Below the logo, the text "Estamos ahí, donde comienza la vida." is written in a bold, sans-serif font. At the bottom of the advertisement, there is a line of text: "Visite nuestra página Web - www.seremas.com - info@seremas.com - consultas@seremas.com".

**Figura 3.** Fotografía de los tres embriones obtenidos.



**Figura 4.** Fotografía de cada embrión transferido magnificado.



En el mes julio de 2008 se efectuó la transferencia embrionaria a las 48 hs del ICSI con catéter de Wallace guiado con ecografía abdominal (Figuras 3 y 4). Doce días después de la transferencia se diagnosticó el embarazo mediante la determinación de  $\beta$ -hCG en sangre. Se confirmó a las 48 hs la duplicación de los valores y se efectuó la primera ecografía a la 5ª semana de su embarazo, observándose dos sacos embrionarios, pero sólo uno de ellos con latidos positivos.

El parto se produjo en el mes de abril del presente año.

### Vitrificación

Se realizó la vitrificación de los ovocitos por el método de Kuwayama.<sup>4</sup> Para ello se utilizaron los medios comerciales (*Irvine Scientific*) y el dispositivo *Cryolock*. Brevemente, se expone a los ovocitos a las soluciones de vitrificación para finalmente "montarlos" en el *Cryolock*, minimizando el volumen de medio de vitrificación en el cual se depositan. Se sumergen directamente en nitrógeno líquido, se coloca con cuidado la tapa del *Cryolock* y se almacenan en termos de nitrógeno.

### Descongelación

Para la descongelación de los mismos (*warming*), también se utilizaron los medios comerciales (*Irvine Scientific*). Una vez descongelados, se dejó estabilizar los ovocitos Metafase II durante 4 horas en una cápsula de cultivo con microgotas de ECM (*Early Cleavage Medium, Irving Scientific*) suplementado con HSA (*Human Serum Albumin, Irving Scientific*) en estufa gaseada. Luego de este lapso se realizó la técnica de ICSI. A las 48 horas los embriones presentaban 2 células, 3 células y 4 células, todos de buena calidad (clase III), los cuales fueron transferidos al útero.

### Comentarios

El grupo de Chen y col, publica en 1986 el primer embarazo luego de la congelación de ovocitos humanos.<sup>5</sup> Pero rápidamente quedó claro que, a diferencia de la criopreservación de embriones, la congelación de ovocitos tenía muy baja eficiencia y los resultados no eran fácilmente reproducibles.

Varias líneas de investigación surgen para estudiar la biología de la criopreservación de ovocitos de mamíferos. Desde aquellas que exploran variaciones en los medios de congelación y en las sustancias crioprotectoras utilizadas, hasta el desarrollo de diferentes metodologías como la congelación lenta, la vitrificación o ultra-vitrificación, todas ellas sin demasiado éxito.

Por el año 1990 la vitrificación apareció como la solución mágica para remediar la baja sobrevida de los ovocitos post-descongelación,<sup>6</sup> pero pronto aparecieron varios trabajos demostrando problemas genéticos de origen ovocitario y de defectos durante el desarrollo fetal con esta técnica.<sup>7</sup> Cuando se utilizaba el Dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector se observaban alteraciones en los embriones como poliploidías digénicas y aneuploidías maternas, mientras que cuando se utilizaba Propanediol (PrOH) se observaba una alta incidencia de activación partenogénica. Estas alteraciones estarían asociadas a la alta concentración requerida de los crioprotectores para realizar la vitrificación.<sup>8</sup>

Las mayores preocupaciones al criopreservar ovocitos son el daño del huso meiótico, la presencia de alteraciones cromosómicas y la partenogénesis. Todos estos defectos están asociados a la configuración nuclear específica del ovocito Metafase II maduro. Los trabajos publicados confirman que el mayor problema radica en la sensibilidad del huso meiótico y de los cromosomas que allí se encuentran ubicados durante el estadio de Metafase II y que son sensiblemente afectados cuando se realiza la técnica de criopreservación.

De esta manera la mejor solución pareció ser la criopreservación de ovocitos en el estadio de vesícula germinal en la que los cromosomas aparecen prolijamente protegidos por la membrana nuclear. Pero el citoplasma de estos ovocitos inmaduros representó el gran problema, ya que el potencial de desarrollo de los embriones formados a partir de ellos manifestó grandes deficiencias.<sup>9,10</sup> Así se volvió sobre la criopreservación de los ovocitos en el estadio de Metafase II.

Finalmente, en 1997 nace el primer bebé luego de la criopreservación de ovocitos en Metafase II, realizada por el grupo de Porcu y col,<sup>11</sup> por el méto-

do descrito en 1995 por Gook, utilizando Propanediol como crioprotector y el método de congelación lenta.<sup>12</sup>

A partir de ese momento los resultados en términos de sobrevida, tasas de embarazo y de implantación, luego de sutiles modificaciones de los protocolos existentes, fueron mejorando. Sin embargo, no pueden obviarse los numerosos trabajos que existen en la literatura donde se señala un riesgo aumentado de alteraciones cromosómicas en estos ovocitos luego de descongelados, las bajas tasas de implantación asociadas a la mayor incidencia de aneuploidías de los embriones formados, además del hecho de que la realización de un seguimiento serio de los nacidos vivos es complejo debido a su pequeño número. Son aproximadamente 150 los bebés nacidos por este método desde 1997.

La vitrificación es un método de criopreservación en el cual las soluciones se vuelven sólidas cuando se las enfría a una tasa extremadamente alta de enfriamiento, formando un estado similar al vidrio, evitando, por lo tanto, la formación de hielo intracelular.

En 2001 ya se publicó un trabajo sobre vitrificación modificando la tasa de enfriamiento y calentamiento. De esta manera se minimizaba el daño asociado con el hielo intracelular y extracelular, el enfriamiento y el *shock* osmótico. Estos trabajos abrieron el camino para retomar la vitrificación en ovocitos con resultados excelentes.

Los resultados cambiaron radicalmente cuando el equipo de Kuwayama y col, publicó en 2005 una metodología con pequeñas modificaciones, variando sobre todo la velocidad de descenso y de ascenso de la temperatura y el volumen de medio de congelación que se utilizaba en relación con el volumen del ovocito. A partir de ese momento esta técnica demostró excelentes resultados en términos de sobrevida y competencia posterior del ovocito, que se reflejan en excelentes tasas de embarazos e implantación y nacidos vivos como lo demuestran los numerosos trabajos publicados. Pero es a partir de 2006 cuando aparecen varias publicaciones utilizando la técnica de vitrificación con estas modificaciones metodológicas

que marcan una gran diferencia no sólo en la tasa de sobrevivencia, sino también en la tasa de embarazo conseguida luego de la transferencia de embriones obtenidos a partir de ovocitos vitrificados y descongelados.

Las indicaciones de esta metodología se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Pacientes que deberán ser sometidas a quimioterapia y/o radioterapia debido a un cáncer en las que la estimulación de la ovulación no esté contraindicada. La mayoría de las mujeres que curen de su cáncer muy probablemente quedarán con problemas de fertilidad.
2. En casos de mujeres que deciden demorar la maternidad por cuestiones personales o profesionales.
3. Para facilitar enormemente los procedimientos de donación de óvulos.
4. En casos de imposibilidad de obtener espermatozoides el día del tratamiento.
5. En situaciones donde no se pueda proceder a la transferencia de embriones por diversos motivos.

Este tipo de método de congelación y los resultados presentados demuestran que su utilización puede hoy ser considerada como una herramienta más de nuestra práctica. Sin embargo, hay que remarcar que no trata ni debe reemplazar a la congelación de embriones, siempre y cuando la paciente no tenga objeciones para este último método, ya que la congelación de ovocitos persigue fines diferentes que la congelación de embriones.

Además, si bien uno de sus potenciales usos es la preservación de la fertilidad futura en casos de mujeres que quieren posponer su maternidad, este punto debería ser analizado en cada caso en particular.

## Referencias

1. Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 degrees C. *J Reprod Fertil* 1977;49(1): 89-94.
2. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305(5936):707-709.
3. Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkman CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984;42(2): 293-296.
4. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11(3): 300-308.
5. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1(8486): 884-886.
6. Surrey ES, Quinn PJ. Successful ultrarapid freezing of unfertilized oocytes. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1990;7(5):262-266.
7. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Nerinckx S, Van Steirteghem A. Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of the mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. *Cryobiology* 1992;29(5): 549-562.
8. Van der Elst J, Amerijckx Y, Van Steirteghem A. Ultrarapid freezing of mouse oocytes lowers the cell number in the inner cell mass of 5 day old in-vitro cultured blastocysts. *Hum Reprod* 1998;13(6):1595-1599.
9. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG, Merriman JA, Choudhury N. Cryopreservation of immature mouse oocytes. *Hum Reprod* 1994;9(9):1738-1742.
10. Ruppert-Lingham CJ, Paynter SJ, Godfrey J, Fuller BJ, Shaw RW. Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryopreservation: loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing. *Hum Reprod* 2003;18(2):392-398.
11. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;68(4):724-726.
12. Gook DA, Osborn SM, Johnston WI. Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1995;10(3):654-658.