

Primer embarazo en el Noroeste Argentino por técnica de vitrificación

Juan José Aguilera, Miguel Alfredo Córdoba Lisko, Adrián Char

SARESA Centro de Salud Reproductiva, Salta-Argentina
Reproducción 2009;24:25-27

Resumen

Durante el mes de setiembre de 2008 se realizó la vitrificación de 8 ovocitos. En el mes de octubre de 2008 se realizó un procedimiento de ovodonación con ovocitos desvitrificados a dos pacientes receptoras. Se desvitrificaron 8 ovocitos con una tasa de supervivencia de 100% (8/8). Se asignaron 2 ovocitos para la receptora N° 1 y 6 ovocitos para la receptora N° 2. Se realizó inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) convencional en la receptora N° 1 y con semen de origen testicular (biopsia) en la receptora N° 2. La tasa de fertilización fue de 100% para la receptora N° 1 (2/2) y de 50% (3/6) para la receptora N° 2. Las transferencias fueron realizadas a las 48 hs en la receptora N° 1 (2 embriones) y a las 72 hs en la receptora N° 2 (3 embriones). A los 12 días post-transferencia se realizó dosaje de Beta HCG (Gonadotropina Coriónica Humana) constatándose un embarazo bioquímico en la receptora N°1. Cuatro semanas post-transferencia se realizó ecografía transvaginal constatándose embrión con actividad cardíaca positiva de características normales. La receptora N°2 no logró embarazo.

Palabras claves: ovocitos, vitrificación, ovodonación, ICSI, embarazo.

Introducción

La vitrificación es una técnica que permite la criopreservación de óvulos, espermatozoides y embriones. Consiste en la solidificación de una solución a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea, no por formación de cristales de hielo, sino por elevación extrema de la viscosidad usando altas tasas de enfriamiento que van desde 15.000 hasta 30.000° C por minuto. Esto permite el almacenamiento de los ovocitos por

tiempo indefinido.

Hasta ahora las técnicas de congelamiento de ovocitos tenían resultados inaceptablemente bajos, ya que la supervivencia de los mismos luego de la descongelación era alrededor del 10%.

La criopreservación de ovocitos humanos ha sido uno de los desafíos más elusivos para los investigadores en el campo de la reproducción asistida. Desde el primer embarazo logrado con ovocitos criopreservados reportado en 1986 por Chen¹ varios centros alrededor del mundo informaron embarazos.²⁻⁴ Todos ellos fueron logrados con técnicas de criopreservación de enfriamiento lento. La viabilidad de los ovocitos luego de la descongelación era baja como así también la tasa de fertilización, conduciendo este hecho a una baja tasa de embarazos debido al daño producido por los cristales de hielo en el huso meiótico, microfilamentos, zona pelúcida y gránulos corticales.⁵ Este hecho hacía necesario el desarrollo de métodos más eficientes para la criopreservación de ovocitos.

El método de vitrificación se desarrolló durante los años '90. No afecta el huso meiótico ni la alineación cromosómica, evitando así las anomalías genéticas relacionadas con el congelamiento lento.⁶

Además, esta técnica es más simple, más conveniente y más efectiva que la congelación lenta.⁷

De acuerdo con los resultados publicados por numerosos grupos de investigadores,⁹⁻²⁵ es factible ofrecer vitrificación de ovocitos como una alternativa a los pacientes en las siguientes situaciones:

- Mujeres que deban realizar tratamientos que afecten su fertilidad (cáncer, etc.).
- Pacientes con síndrome de hiperestimulación ovárica.
- Pacientes con numerosos ovocitos.
- Pobres respondedoras.
- Mujeres con deseo de postergar su maternidad.

Correspondencia: Juan José Aguilera
E-mail: jaguilera@saresa.com.ar

- Situaciones con dificultad o imposibilidad de realizar la recolección de la muestra de semen.
- Muestra de semen inadecuada.
- Espermatozoides no viables en el momento de la recuperación de los ovocitos.
- Programas de ovodonación simplificando los pasos, ya que los ovocitos pueden ser puestos en cuarentena. Las donantes y receptoras no necesitan sincronizar sus ciclos.

Caso clínico

En el mes de septiembre de 2008 se programó un procedimiento de ovodonación. Se realizó estimulación ovárica controlada a la donante con FSHrec 250 UI/día (*Puregon*) desde el día 2 al 7 del ciclo a partir del cual se administró FSHrec 150UI/día (*Puregon*) más 75 UI de HMG (*HMG Ferring*) y se agregó cetrorelix (*Cetrotide, Serono*) 0.25mg/día hasta reunir criterios para descarga de HCG (*Ovidrel*), (dos folículos con 18mm de diámetro o más).

Al llegar el momento de la recuperación de ovocitos, la receptora no se encontraba en condiciones por pobres características endometriales, por lo que se decide la cancelación del procedimiento y la vitrificación de los ovocitos. Se vitrificaron 8 ovocitos.

En octubre de 2008 se realiza una nueva preparación, en esta oportunidad, de 2 receptoras y se desvitrifican (31 de octubre de 08) 8 ovocitos, de los cuales resultan viables 8 (100%)

Se realizó ICSI en 2 ovocitos para la receptora N° 1 y en 6 ovocitos para la receptora N° 2; la tasa de fertilización fue 2/2 (100%) en la receptora N°1 y 3/6 (50%) en la receptora N° 2.

La transferencia embrionaria se realizó a las 48hs post-ICSI (2 de noviembre de 08) en la receptora N° 1 con 2 embriones de 4 células grado I y 2 células grado I (clasificación Red *LARA*) bajo control ecográfico transabdominal y con la paciente en posición ginecológica.

En la receptora N° 2 la transferencia se realizó a las 72 hs con tres embriones de 8 células grado 2b, 8 células grado 2a y 10 células grado 2 (Clasificación *RED LARA*) bajo control ecográfico transabdominal y con la paciente en posición ginecológica.

La transferencia embrionaria se realizó con set de transferencia *Ultrasoft* de Frydman, CCD.

El endometrio se preparó con valerato de estra-

diol 2mg (*Progynova*) los primeros 7 días subiendo gradualmente hasta llegar a 6-8 mg/día.

Se logró embarazo en una de las pacientes (50%), receptora N° 1.

El embarazo clínico fue confirmado por ecografía a las 4 semanas post-transferencia confirmando saco gestacional intrauterino y actividad cardíaca positiva.

Los procedimientos se realizaron previa firma del correspondiente formulario de consentimiento informado.

Vitrificación

Se vitrificaron 8 ovocitos por la técnica desarrollada por CECOLFES LTDA, Bogotá, Colombia,¹⁰ que es una modificación sobre el método *Cryotop* (Kuwayama).

Transcurridos 60 minutos post-aspiración se procede a la denudación de los ovocitos con hialuronidasa 40 UI/ml. Se realiza observación y clasificación de ovocitos maduros Metafase II (MII). Los mismos fueron almacenados en estufa de cultivo por espacio de 2 horas hasta el momento de la vitrificación.

El proceso de vitrificación se inició con un lavado en solución con *buffer* a temperatura ambiente. Se realizaron cambios progresivos de concentración. Cuando se unen gotas de solución de equilibrio, etilenglicol (EG) y Dimetil sulfoxido (DMSO) las soluciones van aumentando progresivamente las concentraciones de los compuestos anteriores. Todo este proceso lleva aproximadamente 10 minutos. El último paso es la inmersión en solución de vitrificación compuesta por 15% de EG, 15% de DMSO + 0,5 mmol/L de sacarosa. El tiempo máximo de permanencia en esta solución es de 30 segundos y otros 30 segundos para montar los ovocitos en *cryovie* (soporte), y así lograr el Mínimo Volumen de Congelación (MVC). Inmediatamente, en 5 segundos, son colocados en nitrógeno líquido para lograr un flujo térmico de -30.000°C/min.

Desvitrificación

En el primer paso se colocaron los ovocitos en una solución descongelante compuesta por 1mol/L de sacarosa (*Thawing Solution TS*) durante un minuto a 37 °C, luego fueron sumergidos en soluciones con concentraciones decrecientes de

sacarosa, *Devitrification Solution* (DS), para finalmente ser colocados en una solución de lavado, *Washing Solution* (WS) y llevados inmediatamente a solución de *Human Tubal Fluid* (HTF Life Global) + 10% de albúmina humana (Irvine Ltd.), preequilibrada a 37° C y 5% de Dióxido de carbono (CO₂), hasta el momento de realizar ICSI.

Comentario final

La diferencia en la cantidad de ovocitos disponibles para la receptora N° 1 (2) y la receptora N° 2 (6) se debió a los antecedentes de la receptora N° 2 (tercer intento, espermatozoides de origen biopsia testicular con astenoteratospermia severa).

Si bien la tasa sobrevida de los ovocitos vitrificados fue del 100%, el descenso en la tasa de fertilización en la receptora N° 2 (50%) podría deberse al antecedente antes mencionado de un factor masculino severo.

Desde principios de 2008 SARESA adopta el uso del método de vitrificación para criopreservación de ovocitos y embriones debido a su alta tasa de sobrevida, fertilización y desarrollo embrionario, proveyendo una nueva alternativa en el manejo de la infertilidad.

Referencias

- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1:8.
- Gook D, Osborn S, Johnston W. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2 propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993;8:1101.
- Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti P, Magrini O, Flamigni C. Birth of healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;68:724-726.
- Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M, Marazzi A, Gomez M. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil Steril* 1998;69:555-557.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16:411-416.
- Kuwayama M. Vitrification of human oocytes and embryos [Japanese]. In: *IVF update*. Tokyo: Medical View, 2001:230-234.
- Kuleshova L, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002;78:449-453.
- Katayama P, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80:223-224.
- Yoon T, Kim T, Park S, Hong S, Ko J, Chung H, Cha K. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2003;79:1323-1326.
- Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006;85:108-111.
- Cao Y, Xing Q. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril* 2008;90:S270.
- Chang C, Bernal D, Elsner C, Toledo A, Slayden S, Nagy P. The impact of oocyte vitrification on laboratory and clinical outcomes in 30 to 38 years old IVF patients. *Fertil Steril* 2008;90:S271.
- Cil P, Bang HK, Oktay A. Meta-analytic comparison of oocyte vitrification success rates with slow freezing and the SART IVF data with unfrozen oocytes. *Fertil Steril* 2006;86:S126.
- Kim J, Hong S, Cha Y. Vitrified oocytes produce excellent pregnancy rate. *Fertil Steril* 2006;86:S126-S127.
- Kim T, Hong S. Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women. *Fertil Steril* 2008;90:S289.
- Nagy P, Chang C, Bernal P, Mitchell-Leef D, Shapiro B, Kort I. The integration of cryo-egg bank into the oocyte donation program. *Fertil Steril* 2008;90:S289.
- Nagy P, Chang C, Shapiro B, Mitchell-Leef D, Elsner W, Kort I. Obstetrical and perinatal outcome of pregnancies following oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2008;90: S289-S290.
- Smith GD, Fioravanti J, Hassun A, Alegretti R, Motta L, Serafini P. Prospective randomized controlled study of human oocyte cryopreservation by slow-rate freezing and/or vitrification. *Fertil Steril* 2006;86:S96.
- Ruvalcaba L, Martínez R, Cuneo S, Chanona J, Beltrán M, Bermúdez A. Improving Donor Programs With An Oocyte Bank Using Vitrification. *Fertil Steril* 2005;84: S70.
- Cubillos S, Sanchez S, Charría G, Cervantes E, Aparicio H, Cuneo S. Successful vitrified oocyte donation program with blastocyst transfer. One year of follow up study in Mexico City. *Fertil Steril* 2008;90:S72.
- Huang J, Ruvalcaba-Castellon A, Garcia Amador I, Lucena E, Saa A, Chian C. Obstetric and perinatal outcomes in pregnancies conceived by vitrified oocyte in three centers. *Fertil Steril* 2007;88:S352.
- Chavez-Badiola A, Ruvalcaba-Castellon A, Zhang J, Garcia-Amador I. Technique safety: oocyte vitrification. Live-births' long-term follow-up. *Fertil Steril* 2008; 90:S205.
- Kim T, Hong S, Cha K. Pregnancies from cryopreserved oocytes using vitrification protocol. *Fertil Steril* 2005; 84:S179.
- Ricardo F, Wojciechowska M, Rokicki R, Barak Y. Establishment of oocyte vitrification in IVF centre in Poland. *Fertil Steril* 2008;90:S425.
- Okimura T, Kato K, Zhan Q, Kuwayama M, Zhang J, Kato O. Update on Clinical Efficiency of the Vitrification Method for Human Oocytes in an In Vitro Fertilization Program. *Fertil Steril* 2005;84:S174.