

La vitrificación: nueva era en criopreservación embrionaria

The vitrification: new age in embryonic cryopreservation

Beatriz Migueles Pastor¹, Mónica Dorado Silva¹, María Hebles Duvison², Mercedes González Martínez¹, Laura Aguilera Duvison¹, Gema Nuñez Rivas², Pascual Sánchez Martín², Fernando Sánchez Martín².

¹Fundación Guadalquivir de Investigación Médica. Sevilla.

²Clínica Ginemed. Sevilla.

Resumen

En este estudio vamos a comparar los resultados obtenidos con la criopreservación mediante la vitrificación, (técnica que comenzamos a usar de forma rutinaria en Enero de 2007) y la congelación lenta (protocolo de criopreservación usado hasta ese momento). Se han analizado un total de 394 ciclos en los que se realizó el calentamiento o desvitrificación de los embriones en el periodo comprendido entre Enero de 2007 hasta Abril de 2009. En 175 ciclos los embriones fueron preservados por congelación lenta y en 219 ciclos los embriones fueron vitrificados; en ninguno de los dos protocolos seleccionados se valoró la calidad embrionaria a la hora de criopreservar los embriones. Las tasas tanto de supervivencia (67,9% vs 89,8%), evolución (51,7% vs 72,8%) y embarazo (6,85% vs 38,81%) son significativamente mayores para los embriones que fueron vitrificados. Los resultados obtenidos nos han permitido introducir la vitrificación de manera rutinaria y aplicarla en todos los estadios de desarrollo del embrión.

Palabras clave: Vitrificación. Tasa de supervivencia. Cryotop.

Summary

In this study we are going to compare the results obtained with the cryoconservation through vitrification (a technique that we began to use permanently from January 2007) and those obtained through the slow embryos freezing (cryopreservation procedure actually in use).

It was analyzed 394 cycles and in all of these we realized the warming or defrost of embryos from January 2007 until April 2009. In 175 cycles the embryos were frozen by using slow embryo freezing procedure, embryo quality wasn't evaluated in any case of the selected procedures before proceeding with embryo cryopreservation. The rate of survival (67.9% vs 89.8%) evolution (51.7% vs 72.8%) of embryos and pregnancy (6.85% vs 38.81%) is higher by using vitrified embryos procedure. The results we obtained gave us the opportunity to introduce the vitrification as a regular procedure and to apply it in the different phases of development of embryos.

Key words: Vitrification. Rate of survival. Cryotop.

Correspondencia: Dra. Beatriz Migueles Pastor
C/ Farmacéutico Murillo Herrera nº 3 Bajo
41010 Sevilla
bmigueles@ginemed.es

INTRODUCCIÓN

Desde que en el año 1978 con el nacimiento del primer bebé probeta la fecundación in vitro fue un hecho, uno de los problemas que se planteaba con este tipo de tratamiento fue la preservación de los embriones sobrantes en cada uno de los ciclos que se realizaban. Fue en el año 1983 cuando se describe el primer nacimiento tras la transferencia de embriones congelados previamente y descongelados para su transferencia (1). Esta nueva técnica solucionó el problema de los “embriones sobrantes” en cada ciclo de FIV, y además daba una segunda oportunidad a las parejas donde la transferencia en fresco no había dado resultado, evitando tener que pasar de nuevo por una estimulación ovárica y punción, en otros casos permitía la consecución de un segundo embarazo a partir de un mismo ciclo aumentando así el rendimiento del mismo. También se planteaba como alternativa en casos de complicaciones como el SHO (Síndrome de Hiperestimulación Ovárica) donde no era factible una transferencia en fresco (2). Gracias a la criopreservación de embriones se consigue detener por completo la actividad enzimática, la respiración celular, el metabolismo, el crecimiento, la multiplicación etc., los embriones se pueden mantener sin afectar a su viabilidad ni causar cambios genéticos (3) pudiendo quedar almacenados durante un largo periodo de tiempo a -196°C . Sin embargo esta técnica presentaba una serie de limitaciones ya que el número de embriones disponibles tras la descongelación en determinados casos se veía mermado por la escasa supervivencia de los mismos ó la escasa evolución tras la descongelación (4, 5). En el proceso de criopreservación es necesario un contacto inicial de los embriones con soluciones crioprotectoras, su posterior congelación y su almacenamiento final. Una vez descongelados, hay que diluir y eliminar los crioprotectores antes de pasar a las placas de cultivo donde éstos volverán a retomar el ciclo celular donde se detuvo con la congelación. Durante la congelación lenta se da un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento, la deshidratación y la velocidad en la formación de núcleos de hielo. En este proceso, los embriones son sometidos a un gran estrés (mecánico, térmico y químico) en el que en ocasiones no todas las células son capaces de sobrevivir y en determinadas ocasiones, si lo consiguen, ven comprometida su capacidad de división posterior a esta descongelación.

Antecedentes de la vitrificación

La vitrificación se define como el proceso físico de solidificación de una solución a bajas temperaturas

sin la formación de cristales de hielo, este fenómeno puede ser considerado como un incremento extremo de la viscosidad, que requiere altas tasas de enfriamiento y calentamiento (6). Su desarrollo ha sido paralelo al de la congelación lenta, ya que existen protocolos de vitrificación descritos desde el año 85 (7) en 1985 publicaron un estudio en el que describieron la primera vitrificación exitosa de embriones murinos en estadio de 8 células, usando una mezcla de crioprotectores como DMSO (Dimetil Sulfoxido), Acetamida, Propilenglicol y Polietilenglicol, a la que llamaron “criopreservación libre de hielo por vitrificación”. Posteriormente se describieron con éxito otros protocolos de vitrificación para diferentes especies; en bovino se utilizaba como crioprotector una mezcla de glicerol y propanediol a altas concentraciones (8); en caprinos (9). Sin embargo, no se consigue la primera vitrificación exitosa en humanos hasta el año 1998 (10). Es, sin embargo, en los últimos 5 años cuando la vitrificación ha cobrado importancia debido a los excelentes resultados publicados por los diferentes grupos (11, 12, 2, 13), entre otros.

Los pobres resultados obtenidos en el centro mediante la técnica de congelación lenta nos inclinó a poner en marcha la vitrificación como técnica alternativa a la congelación lenta y tras un periodo de puesta a punto en el laboratorio, en el que solapamos ambas técnicas nos decidimos finalmente por la vitrificación debido a los buenos resultados obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio muestra los resultados obtenidos tras un total de 175 ciclos de transferencia de embriones criopreservados por vitrificación; de los cuales 126 transferencias corresponden a embriones procedentes de FIV-ICSI Y 49 de ellas corresponden a ciclos de ovodonación.

PREPARACIÓN DE LAS PACIENTES

Las pacientes fueron estimuladas para un ciclo inicial de FIV-ICSI. Las pautas elegidas se realizan según (14, 15).

PROCESO DE VITRIFICACIÓN

Los embriones excedentes del ciclo de FIV-ICSI fueron vitrificados en día +2 ó +3 post-aspiración folicular en función del momento de la transferencia embrionaria. El método utilizado para la vitrificación fué la técnica del Cryotop (12). Los embriones fueron

equilibrados en una solución de equilibrio ES: (7,5% etilenglycol (EG) + 7,5% dimetil sulfóxido [DMSO] en medio Ham F-10 (Gibbco) +20% SSS (Serum Sustitutivo Sintético) (IRVINE) durante un periodo entre 5 y 15 minutos en función del estadio celular de los embriones vitrificados. Seguidamente los embriones son emplazados en una solución de vitrificación VS: (15% etilenglycol (EG)+15% dimetil sulfóxido [DMSO]+ 0,5M de Sucrosa en medio Ham F-10 (Gibbco) suplementado al 20% con SSS (Serum Sustitutivo Sintético) por un periodo no superior a 1 minuto. Pasado este tiempo, los embriones son colocados en el Cryotop procurando que arrastren un MVC (mínimo volumen de congelación), para que la tasa de enfriamiento al ser sumergidos directamente en el nitrógeno líquido sea la adecuada (-23.000° C/min) (12).

WARMING DE LOS EMBRIONES

Para la desvitrificación (Warming) de los embriones, sacamos el Cryotop del nitrógeno líquido y se sumerge de forma inmediata en la solución Thawing en un periodo nunca superior a un minuto: (1.0 M de sucrosa en Ham F-10 suplementado con SSS) que estará a una temperatura de 37 °C, consiguiendo así una tasa de calentamiento adecuada (12.000 °C/min). Pasado este tiempo, los embriones son transferidos a una so-

lución de dilución: DS durante 3 minutos (0,5 M de sucrosa en Ham F-10 suplementado con SSS). Una vez transcurrido este tiempo, los embriones son transferidos a la placa de cultivo donde se realizarán sucesivos lavados en el medio de cultivo adecuado en función del estadio celular de los embriones que se acaban de desvitrificar.

Los embriones permanecerán en esta placa 24 horas en cultivo antes de ser transferidos a la paciente adecuadamente prep a rada para la realización de la misma (14).

RESULTADOS

Se compararon los resultados obtenidos tras descongelación lenta y vitrificación. Se descongelaron un total de 1929 embriones procedentes de ciclos de ICSI y ovodonación: 796 embriones habían sido congelados mediante el protocolo de congelación lenta (14) y 1133 fueron desvitrificados según el método del Cryotop (12). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: (Tablas 1 y 2)

Los resultados obtenidos con la técnica de vitrificación son significativamente mayores a los obtenidos por el protocolo de descongelación lenta. Las tasas de supervivencia son mejores en vitrificación y esto se traduce asimismo en unas mayores tasas de evolución embrionaria y de embarazo final (Tabla 3). Estos datos son muy a tener en cuenta, ya que en

Tabla 1

Resultados obtenidos con embriones criopreservados en congelación lenta: tasas de supervivencia y evolución, tanto para ciclos realizados en ICSI como para ciclos realizados en donación de óvulos

CONGELACION LENTA	Nº embriones descongelados	Nº embriones sobreviven	Tasa de supervivencia	Nº embriones evolucionan	Tasa de evolución	p
ICSI	694	491	70,7%	262	53,3%	P<0,01
OVODONACIÓN	102	54	52,9%	18	33,3%	P<0,01
TOTAL	796	541	67,9%	280	51,7%	P<0,01

Tabla 2

Resultados obtenidos con embriones criopreservados mediante vitrificación: tasas de supervivencia y evolución, tanto para ciclos realizados en ICSI como para ciclos realizados en donación de óvulos

VITRIFICADOS	Nº embriones desvitrificados	Nº embriones sobreviven	Tasa de supervivencia	Nº embriones evolucionan	Tasa de evolución	p
ICSI	900	809	89,8%	583	72,06%	P<0,01
OVODONACIÓN	233	209	89,69%	158	75,5%	P<0,01
TOTAL	1133	1018	89,84%	741	72,78%	P<0,01

Tabla 3

Comparativa de las tasas de embarazo obtenidas tras la realización de los ciclos criopreservados en ICSI y Donación de óvulos tanto para Congelación lenta como para Vitriificación

TASA DE EMBARAZO	CONGELACIÓN LENTA	VITRIFICACIÓN	p
ICSI	(19/145) 13,2%	(68/163) 41,7%	P<0,01
OVODONACIÓN	(3/27) 11,18%	(19/56) 35,7%	P<0,01
TOTAL	(22/175) 12,5%	(87/219) 39,7%	P<0,01

nuestro centro no hacemos selección embrionaria a la hora de criopreservar embriones; normalmente se criopreservan todos los embriones sobrantes en ciclos de FIV-ICSI.

DISCUSIÓN

Tras pasar durante unos años inadvertida, a favor de la congelación lenta (hay reportes de la existencia de su aceptación como técnica de criopreservación desde el año 93 (16, 17) siendo los primeros trabajos realizados en el año 1989 (22). La vitriificación está empezando en los últimos años a ser la técnica usada de manera rutinaria en un cada vez mayor número de laboratorios de reproducción asistida. La desconfianza inicial, justificada por las elevadas concentraciones de crioprotector con las que se trabaja (18, 19), y el uso de sistemas abiertos donde los embriones quedan almacenados (11, 6), (en contacto con el nitrógeno líquido (lo que puede constituir una potencial fuente de infección (20), además la diversidad de técnicas, (cada grupo reporta su propia técnica) y la deficiencia de una tecnología estándar probada (19) dió lugar a este recelo inicial. Este ha ido desapareciendo a la vista de los resultados obtenidos en vitriificación ofrecidos por los diferentes grupos de investigación (2, 10-13). La puesta a punto de la técnica no fue fácil, ya que los primeros protocolos aparecidos se probaron a partir de modelos animales, y concretamente a partir de embriones en mamíferos, los cuales nos ofrecieron una gran variedad de protocolos dirigidos a aumentar las tasas de supervivencia embrionaria mediante la disminución del volumen de los crioprotectores utilizados y un aumento de la velocidad de enfriamiento. Estos intentos dirigidos a la puesta a punto de la técnica jugando con los diferentes tiempos de exposición a los crioprotectores y las diferentes concentraciones de los mismos (21), dieron lugar a una cada vez mayor tasa de supervivencia desde estos primeros estudios realizados en el año 1989. La vitriificación es hoy

por hoy la técnica de criopreservación elegida cada vez por más laboratorios ya que simplifica y acelera notablemente el proceso de criopreservación, sin que para ello sean necesario invertir en equipos específicos. Esta técnica elimina en su proceso la formación de cristales de hielo que son la causa del daño celular que presentan los embriones tras descongelar (6) y recupera el ciclo celular obteniéndose una buena tasa de reexpansión in vitro (22), que da lugar a una mejor tasa de evolución y embarazo.

CONCLUSIÓN

Los resultados que la vitriificación ofrece en tasas de supervivencia, evolución y embarazo hacen que sea la más adecuada para conservar los embriones excedentes en ciclos de reproducción asistida. Asimismo, no sólo es la mejor opción en criopreservación embrionaria, los excelentes resultados descritos en óvulos (12, 11, 2) en cigotos (23) y Blastocistos (24) superan los resultados obtenidos por cualquier otro tipo de técnica descrita hasta ahora.

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo de Ginemed.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Trounson A and Mohr L.:** Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of a eight-cell embryo. *Nature*, 1983; 305: 707-709.
2. **Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A.:** Successful ongoing pregnancies after vitriification of oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85: 108-11.
3. **Schneider U, Mazur P.:** Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Human reproduction update*, 1984; 9: 583-605.

4. **Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem A.:** A randomized comparison of the cryopreservation of once-cell human embryos with a slow controlled rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen. *Human Reproduction* 1997; 12: 1554-15560.
5. **Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, McBain JC.:** A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Human Reproduction* 2000; 15: 175-179.
6. **Vajta G, Kuwayama M.:** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 2006; 65: 236-244.
7. **Rall WF, Fahy GM.:** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, 1985; 313: 573-575.
8. **Massip A, Van der Zwalman P, Scheffen B, Ectors E.:** Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo letter*, 1986; 7: 270-273.
9. **Yuswiani E, Hultz, W.:** Successful transfer of vitrified goat embryos. *Theriogenology*, 1990; 34: 629-632.
10. **Mukaida T, Wade S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M.:** Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for the 8-cell mouse embryos. *Human reproduction*, 1998; 13: 2874-2879.
11. **Kuwayama M.:** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. *Theriogenology*, 2006; 67 (2007) 73-80.
12. **Ana Cobo Ph.D, Masashige Kuwayama Ph.D, Sonia Pérez Ph.D, Amparo Ruiz M.D, Antonio Pellicer M.D and José Remohí M.D.:** Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the cryotop method. In press, 2007.
13. **Lieberman J, Mawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker M.J.:** Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of Reproduction*, 2002; 67: 1671-1680.
14. **Dorado M, Hebles M, Migueles B, González M, Sánchez P. Sánchez F.:** Efectos de la eclosión asistida en relación al porcentaje de gestación en embriones criopreservados. *Revista Asebir* 2007; Año 12, nº3; 12-17.
15. **Aguilera Duvison L, Hebles M, Migueles B, González M, Dorado M, Sánchez P, Sánchez F.:** Influencia de la fragmentación del ADN espermático en la calidad de los embriones en ciclos de ICSI. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Vol 25-nº3- Mayo-Junio 2008.
16. **Ali J, Shelton J.N.:** Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993; 99: 65-70.
17. **Zhu SE, Kasai M, Otoe H, Sakurai T, Machida T.:** Cryopreservation of expanded mouse blastocyst by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993; 98: 139-145.
18. **Vatja G, Holm P, Greve T, Callesen H.:** Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Animal Reproduction Science*, 1996; 45: 191-200.
19. **Vatja G.:** Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 2000; 60-61: 357-364.
20. **Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK, Devenish J.:** Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 2003; 46: 146-152.
21. **Van der Zwalmen P, Touati K, Ectors FJ, Massip A, Beckers JF, Ectors F.:** Vitrification of bovine blastocyst. *Theriogenology*, 1989; 31: 270 (Abstr.)
22. **Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H.:** Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology*, 1997b.
23. **Isachenko V, Plamen Todorov P, Dimitrov Y, Isachenko E.:** Integrity rate of pronuclei after cryopreservation of pronuclear-zygotes as a criteria for subsequent embryo development and pregnancy. *Human Reproduction*, Vol.23. Nº 4 pp.819-826, 2008.
24. **Mukaida T, Takahashi K, Kasai M.:** Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. *Reproductive Biomedicine online*, 2003; 6: 221-225.