

Casos Clínicos

Embarazo tras vitrificación de ovocitos donados y diagnóstico genético preimplantacional de embriones en una paciente con fallo ovárico

Pregnancy after vitrification of donated Oocytes and preimplantation genetic diagnosis of embryo in a patient with ovarian failure

Javier I. García, Jimmy Portella, Luis Noriega-Hoces, Luis Noriega-Portella.

Grupo PRANOR de Reproducción Asistida. Clínica Concebir. Lima, Perú.

Resumen

Se reporta el caso de un embarazo logrado después de vitrificar ovocitos donados y realizar el diagnóstico genético preimplantacional embrionario para descartar aneuploidías. Paciente de 41 años con fallo ovárico que recibió ovocitos donados vitrificados. Doce ovocitos metafase II fueron vitrificados y tras la descongelación la sobrevida fue 100%. Todos los ovocitos fueron microinyectados y nueve de ellos mostraron signos de fecundación normal a las 16 horas. En el día 3 de desarrollo, todos los embriones fueron biopsiados y se realizó el diagnóstico genético preimplantacional para cromosomas X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21 y 22 con FISH. Tres embriones fueron normales para los cromosomas analizados y dos embriones en estadio de blastocisto fueron transferidos al útero de la paciente, quien recibió suplemento progestacional durante la fase lútea.

El valor de la β -hCG doce días después de la transferencia embrionaria fue de 941,4 mIU/mL y el ultrasonido mostró un embrión con latido cardíaco a los 28 días post-transferencia. Actualmente el embarazo cursa normal desarrollo.

Palabras clave: Ovocitos. Vitrificación. PGD. FISH. ART.

Summary

The objective of this paper is to report the pregnancy obtained after Oocytes vitrification and preimplantation genetic diagnosis of embryo to discard aneuploidies. A 41 year-old patient with ovarian failure received vitrified donated oocytes. Twelve vitrified oocytes in metaphase II were thawed with survival rate of 100%. All oocytes were microinjected and nine of them showed two pronucleous at sixteen hours after ICSI. On day 3, all embryos were biopsied and the PGD analyses was realized by FISH using probes for chromosomes X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21 y 22 con FISH. Three embryos were

Correspondencia: Dr. D. Javier I. García Ph.D.
Laboratorio de Reproducción Asistida
Clínica Concebir
Los Olivos 364 - San Isidro
Lima, Perú
e-mail: jgarciaf@hotmail.com

assessed as normal from analyzed chromosomes and two blastocysts were transferred to the recipient's uterus where received vaginal luteal supplementation.

Twelve days after the embryo transfer the β -hCG values was 941.4 mIU/mL and the ultrasound showed one sac with one heartbeat at 28 days post transfer. Currently, the development of the pregnancy evolves normally.

Key words: Oocytes. Vitrification. PGD. FISH. ART.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los métodos de criopreservación son herramientas útiles dentro de los programas de reproducción asistida que permiten incrementar las tasas de éxito luego de los ciclos de IVF. En las últimas décadas, la congelación lenta controlada ha sido el método comúnmente usado para cigotos y embriones con resultados aceptables en tasas de sobrevida y embarazo (13, 14).

Asimismo, la criopreservación de ovocitos humanos es una opción importante en la implementación de los bancos de ovocitos que permitirían en los programas de donación, la cuarentena adecuada hasta que el screening de las donantes sea completado y una adecuada sincronización con la receptora; además resulta importante en aquellas pacientes que pueden ver afectada su fertilidad por efectos de la edad o tratamientos médicos y quirúrgicos (30). Son diversos los reportes de criopreservación de ovocitos humanos con tasas aceptables de fertilización y clivaje (4, 7), pero con resultados variables en tasas de embarazo (24, 29, 33).

Sin embargo, los crioprotectores y el agua intracelular son los principales factores que afectan principalmente a la sobrevida de ovocitos y posterior desarrollo embrionario, por lo cual criopreservación de ovocitos no ha sido un método rutinario dentro de las tecnologías de reproducción asistida (ART) (25).

Recientemente, se vienen aplicando métodos de vitrificación para criopreservar ovocitos y embriones (1, 14), los cuales basándose en altas tasas de enfriamiento (-107°C/s) (26) y elevadas concentraciones de crioprotector resultan en una rápida transición del citoplasma hacia una estructura vidriosa transparente (glass-like) libre de hielo (12). Kuwayama (10) demostró que la vitrificación no afectaría al huso meiótico ni el alineamiento cromosómico evitando las anomalías relacionadas a las técnicas de congelación lenta. En cambio, estudios de microscopía electrónica han demostrado la sensibilidad de huso meiótico y microtúbulos al proceso de congelación-descongelación

que causaría el riesgo de aneuploidías durante el desarrollo preimplantacional (32).

El screening de aneuploidías mediante el diagnóstico genético preimplantacional (PGD) ha mejorado los resultados de embarazo, incrementando las tasas de implantación embrionaria y reducido significativamente las tasas de aborto (19, 20). Asimismo, las aneuploidías causan reducidas tasas de embarazo y elevadas pérdidas de embriones derivados de ovocitos criopreservados (5).

CASO CLÍNICO

Una donante anónima de 20 años fue estimulada a partir del día 2 del ciclo con 2000 UI de FSH recombinante (Puregon®, Organon) y 0,25 mg de antagonista de la GnRH (Orgalutran®, Organon). El crecimiento folicular fue monitorizado diariamente por ecografía transvaginal y se programó la aspiración ovular cuando la menos 3 folículos tuvieran un diámetro de 18 mm. La punción folicular se realizó 36 horas después de la administración intramuscular de la hCG (Ovidrel® 250 μg , Laboratorios Serono). Doce ovocitos metafase II fueron recuperados en medio de cultivo Global® HEPES (IVFonline, Canadá) suplementado con 10% vol/vol de suero sintético sustituto (SSS, Irvine Scientific, USA), luego de quitarles el exceso de cúmulo fueron mantenidos en medio de cultivo Global® Fertilization (IVFonline, Canadá) + 10% SSS bajo aceite mineral en incubador a 37°C y una atmósfera de 5,6% CO_2 , 5% de O_2 y 89,4% N_2 . Tres horas después de la aspiración los ovocitos fueron denudados con hialuronidasa (80 UI/mL; IVFonline, Canadá) y posteriormente vitrificados con el método del Cryotop de volumen mínimo (8, 9, 11). La vitrificación fue realizada con soluciones de vitrificación (Cecolfes, Colombia) y los ovocitos fueron colocados en un Cryolock (Biodiseño Ltda, Colombia). En dos pasos, los ovocitos fueron equilibrados en solución diluyente (DS Solution; 15% Etilenglicol + Dimetilsulfóxido), luego colocados en la solución de vitrificación (VS Solution; 15%

Etilenglicol + Dimetilsulfóxido + 0,5 mmol/L sucrosa), cargados rápidamente en el cryolock (3 ovocitos/cryolock) en un volumen de aproximadamente 1-2 uL de VS y sumergidos directamente hacia el nitrógeno líquido con una tasa de enfriamiento de aproximadamente -23,000°C/min (11).

Los ovocitos fueron descongelados con una tasa de calentamiento rápido de aproximadamente 12,000°C/min (11) sumergiendo los Cryolock con ovocitos en solución de desvitrificación (TS solution; 1 mol/L de sucrosa) por un minuto y luego pasados rápidamente a solución diluyente conteniendo 0,5 mol/L sucrosa (DS solution) por 3 minutos a temperatura ambiente y dos lavados consecutivos en medio de lavado (Cecolfes, Colombia). Los ovocitos fueron colocados en medio Global® Fertilization (IVFonline, Canadá) suplementado con 10% vol/vol de SSS (Irvine Scientific, USA) bajo aceite mineral a 37°C en una atmósfera de 5,6% CO₂, 5% de O₂ y 89,4% N₂ por 2-4 horas para evaluar su viabilidad antes del ICSI (día 0). La inyección de los ovocitos (n=12) fue realizado con espermatozoides de la pareja receptora y 16 horas después se evaluó la presencia de pronúcleos (día 1). Nueve ovocitos fecundaron normalmente (2PN) y mostraron un clivaje normal 24 horas después. El desarrollo y morfología embrionaria fue evaluada cada 24 horas.

La indicación de diagnóstico genético preimplantacional (PGD) tuvo como indicación un resultado alterado de FISH previo en espermatozoides. El resultado indicaba un alto porcentaje de espermatozoides portadores de disomías para el cromosoma 18 (1,20%; p<0,0001), cromosomas XX (2,20%; p<0,0001) y cromosomas YY (2,40%; p<0,0001).

La biopsia de blastómeras fue realizada en el día 3

de desarrollo mediante métodos previamente descritos (21) cuando los embriones tuvieron entre 7-8 blastómeras. Sesenta y cinco horas después de la inseminación, cada embrión individual fue colocado en medio de biopsia libre de calcio/magnesio (PGD Biopsy Medium; IVFonline, Canadá), el drilling de la zona pelúcida fue realizado con solución ácida de Tyrode y se aspiró mecánicamente una blastómera nucleada. Las blastómeras fueron fijadas individualmente siguiendo un protocolo establecido y mediante la técnica de Carnoy (31). Después de la biopsia los embriones fueron lavados y cultivados individualmente, bajo aceite mineral, en gotas de 10 uL de medio Global (IVFonline, Canadá) suplementado con 10% vol/vol de SSS (Irvine Scientific, USA) hasta el día de la transferencia.

El análisis de PGD fue realizado por FISH usando pruebas específicas para nueve cromosomas X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21 y 22 (Multivision PB; Vysis, Downer's Grove IL, USA). Un total de tres embriones resultaron normales para los cromosomas analizados, dos de los cuales fueron transferidos en estadio de blastocisto al día 5 de desarrollo; el tercer embrión normal detuvo su desarrollo y degeneró en estadio de mórula. Los embriones anormales remanentes fueron cultivados para observar su potencial desarrollo (Tabla 1).

El endometrio de la paciente fue preparado para recibir a los embriones mediante la administración de Estrógeno vía oral, Progesterona vía vaginal y el grosor endometrial monitorizado mediante ecografía transvaginal. La transferencia embrionaria se realizó con un catéter Frydman Ultrasoft (CCD Laboratoire, Paris, France) que fue previamente lavado con medio de cultivo y de acuerdo a métodos previamente des-

Tabla 1

Número de señales observadas para cada una de las sondas específicas para los cromosomas X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21 y 22 de los embriones derivados de ovocitos vitrificados

Emb N°	Estadio Día 3	XY	13	15	16	17	18	21	22	Resultado	Estado
1	9 cel	XY	2	2	2	2	2	2	2	Normal	Transferido
2	8 cel	XY	2	2	2	2	2	2	2	Normal	Detenido
3	7 cel	—	—	—	—	—	—	—	—	No Núcleo	Detenido
4	8 cel	XX	2	2	2	2	3	2	2	Trisomía 18	Detenido
5	8 cel	XX	1	1	2	2	2	1	2	Anormal	Detenido
6	8 cel	XY	2	1	1	1	2	0	1	Anormal	Detenido
7	8 cel	XX	1	3	2	2	3	2	1	Anormal	Detenido
8	8 cel	XY	2	2	1	2	2	0	2	Anormal	Detenido
9	8 cel	XY	2	2	2	2	2	2	2	Normal	Transferido

critos por Mansour (17). El catéter fue llenado completamente con medio de cultivo y los embriones cargados en los últimos 10 uL de medio del catéter.

El valor de la β -hCG doce días después de la transferencia embrionaria fue de 941,4 mIU/mL y el ultrasonido mostró un embrión con latido cardíaco a los 28 días post-transferencia. Actualmente el embarazo cursa normal desarrollo.

Este es un caso reporte del embarazo obtenido con ovocitos donados vitrificados y diagnóstico genético preimplantacional de embriones en una paciente con falla ovárica cuya pareja tenía un resultado de FISH en espermatozoides alterado. Consentimientos escritos para la realización del PGS fueron obtenidos de la pareja para realizar de los procedimientos.

DISCUSIÓN

Nuestro reporte muestra la factibilidad de la vitrificación de ovocitos donados para ser usados en pacientes con falla ovárica prematura o natural y que en combinación con PGD permiten descartar problemas genéticos transmisibles en aquellas parejas con altos riesgos de aneuploidías. Asimismo, estos resultados demuestran que el proceso de vitrificación de ovocitos resulta en altas tasas de sobrevivencia, fecundación y desarrollo embrionario. Resultados similares fueron reportados por Katayama y col. (8), Kuwayama y col. (11) y Lucena y col. (16) en los mismos parámetros evaluados.

Los procesos de congelamiento de ovocitos a temperaturas subzero inducen daños irreversibles predominantemente a nivel de las gotas de lípidos en el citoplasma y los microtúbulos incluyendo el huso meiótico (3, 15, 34); siendo la formación de hielo la principal fuente de daño celular. Otros daños inducidos por la congelación incluyen fractura o endurecimiento de la zona pelúcida por liberación de los gránulos corticales que inhiben la penetración del ovocito por el espermatozoide (2) y organelas intracelulares (6, 18).

El huso meiótico es altamente sensible a cambios de temperatura, especialmente enfriamiento, que conducen a rompimientos del huso y dispersión de los cromosomas con un incremento en el riesgo de aneuploidías (16). Los procedimientos de criopreservación buscan que disminuir los daños por enfriamiento en base a los tipos de crioprotector utilizados, las tasas de enfriamiento/calentamiento y el volumen mínimo en el cual los ovocitos son congelados (30).

El proceso de vitrificación evita la formación de hielo intracelular mediante el uso de crioprotectores permeables como el Etilenglicol (EG) y Dimetilsulfóxido (DMSO) y no permeables como la sucrosa que

junto con una alta tasa de enfriamiento resultan en una solidificación vítrea, transparente y libre de hielo de soluciones acuosas a temperaturas subzero (12). Estudios de Kuwayama (10) y Katayama y col. (8) demostraron que la vitrificación no afectaría al huso meiótico ni el alineamiento cromosómico, evitando las anomalías relacionadas a las técnicas de congelación lenta. Por lo tanto la vitrificación resulta una técnica simple, más conveniente y efectiva que la congelación lenta (9).

El screening de aneuploidías en estadio embrionario preimplantacional resulta útil en la identificación de embriones con mayores posibilidades de terminar en un embarazo exitoso. Un estudio reciente que involucró el análisis de nueve cromosomas en embriones en estadio de clivaje mediante FISH, demostró que el 60% de todos los embriones analizados provenientes de mujeres menos de 35 años eran portadores de anomalías genéticas. Además, la tasa de aneuploidía observada se incrementaba a 80% en embriones de mujeres de 41 años (23). Asimismo, los pocos estudios publicados sobre datos de PGD en embriones derivados de ovocitos donados indican inesperadas altas tasas de aneuploidías de 56-57% (22, 27). Estas anomalías son incrementadas en factores masculinos severos y así, ambos padres tendrían un impacto sobre la normalidad del embrión (28). En el presente estudio ha sido observado una alta incidencia de aneuploidía (66,67%). Esto podría ser debido a efectos del procedimiento de vitrificación. Sin embargo, en un estudio previo nosotros hemos observado tasas similares de aneuploidía en embriones, tanto de ovocitos donados frescos, como vitrificados (García 2009; datos no publicados).

Por tanto el procedimiento de vitrificación de ovocitos es una buena alternativa para pacientes con alto número de ovocitos aspirados, mujeres que quieren posponer la maternidad, establecimientos de bancos de ovocitos y casos de infertilidad masculina o problemas asociados con dificultades en la colección de la muestra seminal y/o espermatozoides no viables al momento de la aspiración ovocitaria. En el caso de los bancos de ovocitos, la criopreservación permite realizar un adecuado screening de posibles desórdenes genéticos transmisibles mientras los ovocitos se mantienen en cuarentena, no es necesaria la sincronización entre la donante de ovocito y el ciclo menstrual de la receptora simplificando así los programas de donación ovocitaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Hasani S, Butuhan O, Koutlaki N.: Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair

- to advocate slow-rate freezing? *Reprod Biomedicine Online* 2007; 14: 288-293.
2. **Al-Hasani S, Diedrich K, Van Der Ven, Reineke A, Harjte M, Krebs D.:** Cryopreservation of human oocytes. *Human Reprod* 1987; 2: 695-700.
 3. **Aman RR, Parks JE.:** Effects of cooling and re-warming of the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 1994; 50: 103-110.
 4. **Chen C.:** Pregnancy after human oocytes cryopreservation. *Lancet* 1986; 1: 884-886.
 5. **Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J.:** Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 354-360.
 6. **Dobrinsky JR.:** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 1996; 45: 17-26.
 7. **Gook D, Schiewe MC, Osborn SM, Asch RH, Jansen RP, Johnston WI.:** Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. *Human Reprod* 1995; 10: 2637-2641.
 8. **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.
 9. **Kuleshova LL, Lopata A.:** Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449-454.
 10. **Kuwayama M.:** Vitrification of human oocytes and embryos In: *IVF update*. Tokyo: Medical View, 2001: 230-234.
 11. **Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S.:** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300-308.
 12. **Kuwayama M.:** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67: 73-80.
 13. **Leibo S.:** Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. *Cyba Found Symp.* 1977; 52: 69-96.
 14. **Leibo S, McGrath J, Cravalho E.:** Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology* 1978; 15: 257-271.
 15. **Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW.:** Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Sciences* 1996; 42: 45-53.
 16. **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.
 17. **Mansour R.:** Minimizing embryo expulsion after embryo transfer: a randomized controlled study. *Human Reprod* 2005; 20: 170-174.
 18. **Massip A, Mermillod P, Dinnyés A.:** Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reprod* 1995; 10: 3004-3011.
 19. **Munné S, Magli C, Bahce M, Fung J, Legator MS, Morrison LE.:** Preimplantation diagnosis of the aneuploidias most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1459-1466.
 20. **Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L.:** Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Human Reprod* 1999; 14: 2191-2199.
 21. **Munné S, Sandalinas M, Escudero T.:** Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 91-97.
 22. **Munné S, Ary J, Zouves C, Escudero T, Barnes F, Cinioglu C, Ary B, Cohen J.:** Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomedicine Online* 2006; 12: 340-346.
 23. **Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fischer J, Garrisi M, Tomkin G, Cohen J.:** Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod BioMed Online* 2007; 14: 628-634.
 24. **Porcu E, Fabbri R, Damiano G.:** Clinical experience and applications of oocytes cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 69: 33-37.
 25. **Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R.:** Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997; 68: 724-726.
 26. **Rall WF.:** Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987; 24: 387-402.
 27. **Reis Soares S, Rubio C, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicier A.:** High frequency of chromosomal abnormalities in embryos obtained from oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2003; 80: 656-657.
 28. **Silber S, Escudero T, Lenahan K.:** Chromosomal abnormalities in embryos derived from TESE. *Fertil Steril* 2003; 79: 30-38.
 29. **Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB.:** Clinical application of human egg cryopreservation. *Human Reprod* 1998; 13: 3156-3159.
 30. **Vajta G, Nagy ZP.:** Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine Online* 2006; 12: 779-796.
 31. **Velilla E, Escudero T, Munné S.:** Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for PGD of aneuploidy. *Reprod Biomedicine Online* 2002; 4: 210-217.
 32. **Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R,**

Keefe DL.: Limited recovery of meiotic spindle in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Human Reprod* 2001; 16: 2374-2378.

33. **Wnslow KL, Yang D, Blohm SE, Jossim P, Nguyen**

K.: Oocyte cryopreservation a three year follow-up of sixteen births. *Fertil Steril* 2001; 76(Suppl 1): S120.

34. **Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF.:** Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 769-777.