

Estado actual de la criopreservación

Current status of cryopreservation

Yolanda Mínguez, Juan A. García Velasco
IVI- Madrid, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid

RESUMEN

En la presente revisión se pretende actualizar los conocimientos actuales sobre la congelación tanto de ovocitos como de embriones, haciendo especial hincapié en la vitrificación. El desarrollo alcanzado en los últimos años nos ha permitido confiar cada vez más en nuestros programas de congelación, cambiando en algunos aspectos completamente la práctica clínica. Áreas como la preservación de la fertilidad tanto por motivos oncológicos como sociales, la posibilidad de crear bancos de ovocitos para donación, el poder evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica, el acumular ovocitos en casos de baja respuesta, o incluso el poder segmentar el tratamiento, estimulando, congelando y transfiriendo posteriormente en un ciclo natural son algunas de las opciones que nos permiten estos avances.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2012; 29: 99-111 ©2012 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Palabras clave: *criopreservación de gametos, criopreservación de ovocitos, criopreservación de embriones*

SUMMARY

Our aim is to update the current knowledge on oocyte and embryo freezing, with special emphasis on vitrification. The major advancements achieved in the last few years in the cryo lab have facilitated major changes in our practice. Areas such as fertility preservation for social or oncological reasons, the possibility to create oocyte banks for egg donation programs, the opportunity to avoid ovarian hyperstimulation syndrome, or to accumulate oocyte in low yield patients, or even to offer treatment segmentation by stimulating the ovaries, vitrifying, and then transferring in a natural cycle are some of the options that now open with the development of cryopreservation.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2012; 29: 99-111 ©2012 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Key words: *gamete cryopreservation, oocyte cryopreservation, embryo cryopreservation*

Aceptado 21 Mayo 2012

Correspondencia: C. Juan A. García Velasco, IVI-Madrid.

juan.garcia.velasco@ivi.es

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Secretaría general: Luis A. Quintero. Apdo. Correos 87. 46110 Godella (Valencia) España. Email: contacto@editorialmedica.com

Los avances conseguidos en los últimos años en las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) y en concreto, las mejoras en las condiciones de cultivo y en los criterios de selección embrionaria han traído consigo la disminución del número de embriones a transferir y el aumento de los embriones destinados a criopreservación. Es indudable que un buen programa de criopreservación permite elevar el éxito reproductivo por ciclo en las parejas que necesitan de las TRA para concebir.

Por otro lado, y pese al gran potencial de la congelación de ovocitos dentro de las TRA, durante mucho tiempo las dificultades técnicas a la hora de criopreservar ovocitos han sido enormes. Los protocolos tradicionales utilizados en el laboratorio para congelar embriones no ofrecían resultados satisfactorios al congelar ovocitos ni tampoco embriones en estadio avanzado de blastocisto. Por esa razón en los últimos años se ha suscitado un interés creciente en optimizar los programas de criopreservación, lo que ha derivado finalmente en la introducción de la técnica de la vitrificación como rutina en los laboratorios actuales de embriología clínica.

A lo largo de esta revisión pretendemos valorar tanto algunos aspectos básicos de la criopreservación y su efecto en las células, como el avance que ha supuesto en los centros de reproducción el uso de la vitrificación para preservar ovocitos y embriones.

Efecto de la congelación en las células

El proceso de congelación conlleva cambios físicos y químicos a nivel de la célula que pueden alterar la fisiología de la misma, llegando a ocasionarle daños incluso letales (1). Un buen conocimiento de los principios que rigen la criobiología ha sido fundamental para mejorar los protocolos de congelación, reduciendo estos daños al máximo y mejorando la supervivencia, así como la viabilidad posterior de las células congeladas.

La criopreservación de material biológico tiene lugar normalmente en una solución acuosa, con presencia de diferentes solutos. Para comprender la respuesta celular en esa solución acuosa ante los fenómenos que tienen lugar a bajas temperaturas, no hay que olvidar que el ambiente intracelular es también en sí una solución acuosa y se encuentra separada de la solución acuosa extracelular por medio de la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula y permite el equilibrio osmótico. Por lo tanto, la clave para la supervivencia de la célula a bajas temperaturas radica en el destino del agua intracelular, ligado a su vez a la capacidad de respuesta osmótica de la célula. A bajas temperaturas, el

destino del agua intracelular se ve influenciado por las relaciones fisicoquímicas de calor y agua, y por los cambios de fases entre los estados sólido y líquido de los ambientes intra y extracelulares.

En realidad, el descenso de temperatura resulta en un sistema bifásico en el que coexisten una fracción sólida extracelular ya congelada y una fracción líquida intracelular no congelada. Tener un buen conocimiento de este fenómeno bifásico es fundamental para desarrollar protocolos adecuados de congelación celular (1, 2)

Con el descenso de temperatura, el medio extracelular se cristaliza y la fracción líquida no congelada de las células está expuesta a grandes cambios en su concentración salina. La fase líquida se hace progresivamente más concentrada o hipertónica que la fase sólida (3, 4, 5). En respuesta a esa diferencia de gradiente que se genera entre el medio intracelular y extracelular, el agua fluye hacia afuera de manera que las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con el medio extracelular cada vez más hipertónico (6). Evidentemente este estrés osmótico o cambios en la concentración salina pueden provocar serias alteraciones en la membrana celular y estos cambios se sabe que están directamente relacionados con la velocidad en el descenso de la temperatura. Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse suficientemente rápido y el agua remanente se congela formando hielo intracelular. Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiéndose llegar al colapso celular (7, 8, 9).

Una velocidad de enfriamiento adecuada permite que la célula se deshidrate y concentre intracelularmente de forma correcta, de manera que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimizará (1). Durante todo ese proceso las membranas celulares son las estructuras que generalmente sufren mayor daño, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (10).

El agua representa más del 80% del contenido intracelular y al congelarse forma cristales de hielo, distribuidos aleatoriamente, en el interior de la célula con el correspondiente efecto adverso para la misma. Esos cristales de hielo en expansión generan un daño mecánico, presionando sobre las células y causando planos de fractura que comprometen la viabilidad celular letal (1, 11, 12). Uno de los mayores retos de la criobiología es el control de la cantidad y localización de esos cristales de hielo (13, 14). Se han descrito otros

efectos adversos asociados al sistema bifásico generado durante el proceso de congelación, como son la formación de burbujas por el aumento en el contenido de gas soluble, el incremento en la viscosidad y cambios significativos en el pH (1).

Además de la adecuada velocidad de enfriamiento, la presencia de crioprotectores en una solución acuosa pueden contrarrestar los efectos descritos anteriormente. Los crioprotectores son permeables o no permeables en función de su capacidad para penetrar en el interior de la célula a temperaturas cercanas a 0°C. Los primeros, como el 1,2-propanodiol (PROH), dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol, disminuyen el punto de congelación de la solución, dando más tiempo a la célula para que se deshidrate. Mientras la célula se deshidrata tiene lugar un reemplazo de las moléculas de agua por las de crioprotector, que no se congela en forma de hielo sino que se solidifica formando una sustancia amorfa de consistencia vidriosa (15). Por otro lado, los crioprotectores no permeables, como la sacarosa, actúan generando diferencias de presión osmótica o gradiente osmótico que favorece la deshidratación celular, reduciendo la cantidad de agua en las células y la probabilidad de formación de hielo intracelular, y contrarrestando así el efecto del incremento de solutos (16).

Método tradicional de criopreservación de embriones y ovocitos

Hasta hace poco tiempo, el protocolo de congelación más utilizado para criopreservar embriones era el protocolo conocido como congelación lenta. La congelación lenta es un procedimiento de criopreservación de equilibrio osmótico en el que los embriones se exponen a la acción de crioprotectores y posteriormente a un descenso lento y controlado de temperatura que se realiza en congeladores programables. Inicialmente se emplearon crioprotectores permeables como el glicerol y el DMSO que posteriormente fueron sustituidos por el PROH, considerado más permeable y de menor toxicidad para los embriones, y añadiendo también sacarosa como crioprotector no permeable (17). Durante la fase de equilibrio con los crioprotectores tiene lugar una deshidratación celular controlada y, al mismo tiempo, una entrada de crioprotector en las células. La difusión del agua se produce más rápido lo que ocasiona que la célula se encoja a medida que se deshidrata y que posteriormente recupera su tamaño con la entrada del crioprotector (1).

En este procedimiento la curva o velocidad de enfriamiento debe ser gradual y lo suficientemente lenta como para permitir a las células deshidratarse correctamente y alcanzar un equilibrio osmótico con el medio extracelular. El des-

censo se inicia desde temperatura ambiente a -2°C/min. e incluye la siembra de cristales o seeding aproximadamente a -7°C, lo cual consiste en crear los primeros cristales de hielo en el espacio extracelular (18). Una vez iniciada esa cristalización, ésta se propaga lentamente a toda la solución siendo escaso el riesgo de que se propague al interior de la célula puesto que el interior celular contiene concentraciones elevadas de solutos, y por tanto, un punto de congelación inferior al de la solución.

Tras el seeding, el descenso de temperatura tiene lugar a una velocidad extremadamente lenta (aproximadamente -0,3°C/minuto) para la correcta difusión de los crioprotectores y el mínimo estrés osmótico posible. Un descenso rápido de temperatura podría generar una deshidratación insuficiente y la aparición de hielo intracelular con los consiguientes daños para la célula.

No hay duda que el éxito de este protocolo radica en lograr el adecuado equilibrio entre la proporción de agua que sale de las células y la que se convierte en hielo, y que éste ha sido el método de elección durante años para preservar embriones con resultados satisfactorios de supervivencia y gestación clínica.

Obviamente eso condujo a que los primeros protocolos de congelación de ovocitos se basaran en la congelación lenta de embriones (19, 20). Sin embargo, esos mismos procedimientos perdían su eficiencia al utilizarlos con ovocitos.

Esta falta de eficacia parece obedecer fundamentalmente a la estructura y características del ovocito humano. El ovocito es una célula de gran tamaño (aproximadamente 150 mm de diámetro), elevado contenido de agua y relación área/volumen muy pequeña (21) por tanto a la respuesta del ovocito a la congelación y posterior descongelación. La deshidratación extrema que tiene lugar durante la congelación lenta trae como consecuencia un cambio en su forma esférica con encogimiento de la célula y además el descenso de temperatura también produce alteraciones en el citoesqueleto del ovocito (22, 23). Por otro lado, sabemos que el ovocito maduro en MII tiene los cromosomas localizados en el huso y desprovistos de membrana celular lo que le confiere una especial inestabilidad. Las alteraciones en el sistema microtubular y por tanto en el huso podrían originar una dispersión cromosómica con el consiguiente cambio en la dotación cromosómica y embriones aneuploides, esto último bastante cuestionado en la literatura (24, 25, 26, 27, 28, 29). Se conoce también desde hace tiempo que la congelación y descongelación afecta a otras estructuras sensibles del ovocito como son la zona pelúcida y los gránulos corticales (8, 30).

Es indudable que los protocolos de congelación lenta de ovocitos han mejorado notablemente desde sus comienzos (31), tanto en la mezcla y concentración de crioprotectores utilizados como en la velocidad de descenso de temperatura (20, 32, 33). Pese a ello la variabilidad en los resultados sigue siendo un hecho, con tasas de supervivencia en torno a un 60% (20, 26, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41) y el metaanálisis de Oktay (12) confirma tasa de gestación no superior al 20%. Recientemente algunos grupos incluso han publicado excelentes resultados (42, 43, 44, 45, 46) con tasas de supervivencia del 80%. Sin embargo, la enorme variabilidad y dificultad para reproducir esos resultados clínicos ha llevado al desarrollo de la vitrificación como procedimiento alternativo a la congelación lenta de ovocitos.

Vitrificación

La vitrificación es una técnica de criopreservación de reciente implantación en la mayoría de laboratorios de embriología. Consiste en una congelación de no equilibrio y ultrarrápida, que no requiere de un equilibrio osmótico entre los ambientes intra y extracelular a lo largo del periodo de enfriamiento de la células, sino de una rápida deshidratación utilizando un medio de congelación hiperosmolar y una velocidad de enfriamiento muy elevada. Está basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene los crioprotectores y el nitrógeno líquido. La técnica debe su nombre al fenómeno que tiene lugar cuando una solución, altamente concentrada en solutos, se somete a un descenso rápido de temperatura por debajo de su punto de fusión sin que tenga lugar un cambio de estado. Durante ese proceso, la viscosidad de la solución aumenta de tal manera que las moléculas quedan inmovilizadas y la muestra pasa de estado líquido a un estado sólido de consistencia vidriosa y sin formación de cristales de hielo tanto dentro de las células como en el medio extracelular (47).

Esta técnica fue desarrollada inicialmente para la congelación de tejidos y órganos, en particular córneas e islotes de Langerhans. Sus bases teóricas eran ampliamente conocidas (48), sin embargo, la mejora del procedimiento ya descrito por Nakagata en 1989 (49) ha sido clave para lograr la eficacia requerida en nuestros laboratorios, en especial al criopreservar ovocitos humanos (50, 51). Uno de los principales obstáculos iniciales para la aplicación rutinaria de la técnica era la exposición de los ovocitos, durante largos periodos de tiempo, a altas concentraciones de crioprotectores con la consiguiente citotoxicidad y estrés osmótico para ellos (52). Pequeñas variaciones en la composición del crioprotector, así como en los tiempos y temperaturas de exposición a los mismos, han resultado críticas a la hora de establecer protocolos definitivos y exitosos de vitrificación.

Mientras que algunos autores desarrollaron protocolos muy rápidos con resultados satisfactorios tras una breve exposición a los crioprotectores con deshidratación total de la célula, otras mejoras fueron encaminadas a la combinación de nuevos crioprotectores o a la variación en las concentraciones de los mismos. Una de esas incorporaciones es la del etilenglicol (EG) como crioprotector permeable, de baja toxicidad y rápida difusión a través de la membrana del ovocito, y la sacarosa que actúa regulando la concentración intracelular de EG durante la exposición de los ovocitos al mismo (53, 54). Igualmente con la introducción de un paso previo de preequilibrio en bajas concentraciones de EG y protocolos de descongelación en concentraciones decrecientes de sacarosa se lograron resultados, en tasas de supervivencia y gestación, superiores a los obtenidos hasta entonces con el método de congelación lenta (55, 56).

Hoy en día los protocolos de vitrificación utilizados son muy sencillos. La combinación de crioprotectores más utilizada es la mezcla de etilenglicol (EG), DMSO y sacarosa (57). Además se ha disminuido considerablemente el volumen de medio que contiene las células que se van a vitrificar, aumentando así la velocidad de enfriamiento y reduciendo la concentración de crioprotectores con la consiguiente disminución de toxicidad de los mismos. Para ello se han diseñado diferentes soportes especiales de carga de las células que emplean un volumen reducido, aproximadamente 1 µl, de solución de vitrificación. Soportes como OPS (open pulled Strauss) (53, 58), pipetas flexibles de desnudación (59), microgotas (60), rejillas de microscopía (54, 61), cryoloops (62, 63), Cryoleaf (64) y mallas de nylon (65) han sido empleados en diferentes especies, incluidos los ovocitos y embriones humanos, con relativo éxito. Todos ellos contribuyen a reducir el volumen de solución a vitrificar y a que el contacto de las muestras con el nitrógeno líquido sea directo, alcanzando en definitiva tasas elevadas de enfriamiento con una menor concentración de crioprotectores.

Uno de los dispositivos más novedosos, sencillos y ampliamente extendido por los laboratorios es el Cryotop (66, 67). Fue desarrollado por Kuwayama y consiste en una fina lengüeta de polipropileno (0,4mm de ancho, 20 mm de largo y 0,1 mm de grosor) unida a un mango de plástico, que dispone de un protector que se acopla a ella para proteger las muestras durante el almacenamiento de las mismas. El volumen de medio que acompaña a la célula en este dispositivo es de 0,1 µl, lo que permite disminuir la concentración de crioprotectores al 30% y aumentar la velocidad de enfriamiento a -23.000°C/min y la de calentamiento a -43.000°C/min.

TABLA 1

Indicaciones vitrificación	
Preservación de la fertilidad	Motivos oncológicos Motivos sociales
Creación de bancos para donación	
Alternativa a la creación y congelación de embriones	
Razones médicas	Acumular óvulos en mujeres con baja respuesta Si progesterona elevada el día de la administración de hCG/aGnRH Pacientes con riesgo de desarrollar SHO

Actualmente la vitrificación, utilizando un dispositivo como el Cryotop, ofrece elevadas tasas de supervivencia (90-95%) y unos resultados clínicos similares a los obtenidos con ovocitos frescos (68, 69, 70). Se ha demostrado que la vitrificación no induce tantas alteraciones en el huso meiótico como la congelación lenta y por ello se observa mayor tasa de supervivencia (71, 72). La repolimerización del huso se acelera en los ovocitos vitrificados frente a los congelados (73, 74) y en los ovocitos vitrificados también habría menos presencia de vacuolas y pérdida de gránulos corticales que en los ovocitos congelados (75).

Por otro lado, las continuas mejoras en la técnica la han convertido también en el método de elección para criopreservar tanto ovocitos (76) como embriones en día 3 y blastocisto, con mayor garantía de transferencia y embarazo que con los protocolos tradicionales de congelación lenta (77, 78, 79, 80). Pese a que la mayoría de estudios comparativos randomizados más recientes (81, 82) muestran la superioridad de la vitrificación frente a la congelación lenta, Grifo y Noyes (83) publican tasas de supervivencia similares con la vitrificación y la congelación lenta, e incluso mejor tasa de desarrollo a blastocisto en ovocitos congelados mediante congelación lenta. También cabe destacar el trabajo publicado por Bianchi (46) que muestra tasas de supervivencia similares con ambas técnicas y en el que defiende el desarrollo de protocolos lentos con bajas concentraciones de sacarosa como estrategia de mejora en la criopreservación de ovocitos.

Indicaciones de la vitrificación

La criopreservación de embriones es una técnica cuyas indicaciones, desde el punto de vista clínico, están totalmente definidas desde hace años. Sin embargo, la implantación de la criopreservación de ovocitos es relativamente reciente y las indicaciones se han ido estableciendo de un tiempo a esta parte. La técnica ha supuesto una importante contribución al tratamiento de la esterilidad, aportando una mayor flexibilidad a las técnicas de reproducción asistida que ya

existían y actualmente se considera una opción muy útil en las situaciones concretas que se detallan a continuación:

1-Preservación de la fertilidad.

Los recientes avances en el tratamiento del cáncer no solo mejoran la esperanza de vida de las pacientes sino que también las anima a pensar en su futuro reproductivo, incluso antes de someterse a tratamientos de quimioterapia y radioterapia. Aproximadamente el 9% de las mujeres diagnosticadas de cáncer tienen menos de 45 años (84, 85). Los tratamientos que se les aplican son muy agresivos y ponen en riesgo su función ovárica, por lo que es aconsejable que reciban un asesoramiento adecuado de las opciones de las que disponen para afrontar la maternidad en un futuro y eso incluye preservar su fertilidad antes del comienzo del tratamiento. La American Society of Reproductive Medicine publicó ya en el año 2009 su apoyo al empleo de esta estrategia en pacientes cuya fertilidad se veía comprometida por determinados tratamientos médicos (86). Hasta hace unos años, una de las opciones disponibles para preservar la fertilidad en estas pacientes era la criopreservación de embriones, siempre que la paciente contara con pareja masculina o estuviera dispuesta a generar sus embriones con muestra de semen de banco. Otra opción era la criopreservación de tejido ovárico cuyo autotransplante permitiera además restablecer la función endocrina en la paciente (87, 88, 89, 90, 91, 92). Sin embargo, frente a estas dos posibilidades y con el desarrollo de la vitrificación, la criopreservación de ovocitos se ha posicionado como estrategia de elección en estos casos. En 2008 Cobo sugiere esta opción como la más adecuada, empleando protocolos específicos de estimulación ovárica que ayuden a mantener niveles de estradiol similares a los fisiológicos (93). Otros autores coinciden en la eficacia de la criopreservación de ovocitos para preservar la fertilidad en esta mujeres (94, 95). Además en estas pacientes se intenta prevenir la exposición del tejido canceroso a niveles elevados de estradiol mediante la combinación

de la estimulación ovárica y la administración de tamoxifen y/ o letrozole (96).

Otros autores proponen la maduración in vitro de ovocitos (IVM) y posterior criopreservación de los mismos como alternativa a la estimulación ovárica en esas pacientes (97).

Una indicación más discutida es la preservación de fertilidad por motivos sociales y no por razones médicas. Hablamos de mujeres en edad reproductiva que por diversas causas desean retrasar su maternidad, preservando su fertilidad del paso del tiempo. Las razones pueden ser muy variadas: factores socioeconómicos, ausencia de pareja o desarrollo de su carrera profesional, entre otras. Tradicionalmente la ovodonación era la única vía de embarazo disponible para estas pacientes llegadas a una avanzada edad, sin embargo ahora pueden recurrir a sus propios ovocitos vitrificados anteriormente. Actualmente esta indicación todavía es muy controvertida en algunos países. Lockwood (98) invita a reflexionar sobre esta cuestión y a eliminar el estigma y la limitación a preservar la fertilidad a estas mujeres sin indicación médica. Así el ESHRE Task Force on Ethics and Law en el 2004 (99) no animaba a esta práctica salvo por razones médicas. Sin embargo, este mismo año han publicado un trabajo en el que no desaconsejan la preservación de fertilidad por razones sociales aunque recomiendan asesoramiento adecuado a las mujeres interesadas en someterse a esta práctica (100).

2- Creación de bancos para donación.

Tradicionalmente los programas de donación de ovocitos han funcionado utilizando ovocitos frescos y el éxito del programa ha requerido una adecuada preparación endometrial y perfecta sincronización entre la receptividad endometrial de la receptora y la disponibilidad de ovocitos procedentes de una donante previamente asignada. Sin embargo, la incorporación reciente de la criopreservación de ovocitos ha supuesto una revolución en el campo de la donación de ovocitos y en poco tiempo su uso se ha extendido ampliamente. Cobo (69) demuestra que el empleo de ovocitos de banco no resta eficacia clínica al programa de donación de ovocitos y que los resultados clínicos obtenidos son comparables a los obtenidos con ovocitos frescos. El uso de ovocitos criopreservados o de banco ofrece numerosas ventajas al programa de donación. Una de las más importantes es que desaparece la dificultad para conseguir la adecuada sincronización entre donante y receptora. El estudio de Cobo (69) muestra el elevado riesgo de cancelación por sangrado endometrial o espera prolongada más allá de 50 días en las receptoras de ovocitos frescos, a dife-

rencia de las receptoras de ovocitos de banco en las que no se observó cancelación alguna por esas razones. Los ovocitos criopreservados también benefician a pacientes que residen en otra localidad o incluso en otro país. En esos casos el banco de ovocitos resulta muy ventajoso desde el punto de vista logístico, permitiendo planificar con antelación el ciclo e incluso la fecha del transfer y así facilitando a la paciente la organización de su viaje para realizar la transferencia embrionaria.

Por otro lado, el uso de ovocitos de banco convierte la donación de ovocitos en una técnica más segura al disponer de una ventana temporal para el screening de la donante. Aunque actualmente las donantes de ovocitos son testadas antes de una donación en fresco, es cierto que los ovocitos no guardan una cuarentena como ocurre con la donación de semen. Con los ovocitos de banco se guardaría, al igual que ocurre con los bancos de semen, una cuarentena para testar a las donantes de enfermedades infecciosas y aumentar la protección de las receptoras, eliminando la posibilidad de transmitir alguna enfermedad en ventana inmunológica y no detectable el día de la donación en fresco de esos ovocitos.

Además el banco de ovocitos permitiría incluso distribuir los ovocitos de una misma donante entre varias receptoras sin la dificultad de la sincronización entre todas ellas (101), convirtiendo así la donación de ovocitos en un programa no solo más sencillo de gestionar que con ovocitos frescos sino también más rentable desde el punto de vista económico.

3- Alternativa a la criopreservación de embriones

En algunos casos, la criopreservación de parte de los ovocitos de una paciente podría ser una alternativa a la criopreservación de embriones y podemos considerarla una solución al problema ético y legal que supone el almacenamiento de embriones en los bancos durante tiempo indefinido. Además de las consecuencias que este almacenamiento masivo de embriones tiene para el centro de reproducción donde permanecen, no olvidemos que algunas parejas manifiestan su deseo expreso de no criopreservar embriones e incluso de inseminar tan solo parte de sus ovocitos. Por otro lado, restricciones legales existentes en algunos países no permiten la criopreservación embrionaria y eso ha supuesto una motivación para desarrollar protocolos exitosos de criopreservación de ovocitos. Actualmente la vitrificación permite preservar los ovocitos maduros no utilizados en el ciclo en fresco y poder utilizarlos con las mismas garantías de éxito en un ciclo posterior tras su desvitrificación.

4- Razones médicas

Las indicaciones para criopreservar ovocitos han ido aumentando progresivamente e igualmente han aumentado el número de pacientes que se puede beneficiar de esta técnica.

Se ha publicado hace unos meses el empleo de la criopreservación de ovocitos y acumulación de los mismos como estrategia en el tratamiento de la paciente diagnosticada como baja respondedora (102). Pese a que la tasa de supervivencia de los ovocitos obtenida en el estudio era menor que la descrita por el mismo grupo en pacientes normo-respondedoras, los resultados clínicos muestran la eficacia de esta estrategia. La acumulación de ovocitos de varias estimulaciones y la posterior programación de un ciclo de ICSI con todos ellos permite obtener una mayor cohorte de embriones para seleccionar y transferir, y podría ofrecer un tratamiento alternativo a pacientes bajas respondedoras, con más posibilidades de embarazo de las que disponían hasta ahora.

Recientemente también se ha sugerido la ventaja de diferir la transferencia en pacientes con niveles de progesterona (P4) elevada y criopreservar los ovocitos o embriones para su utilización en un ciclo posterior. Niveles elevados y prematuros de P4 se correlacionan con una asincronía entre endometrio y embrión, perjudicando la receptividad endometrial e impactando negativamente en las tasas de gestación e implantación (103, 104). Shapiro encuentra que en pacientes con $P4 > 1.0$ ng/mL la tasa de implantación y gestación evolutiva aumenta al congelar los cigotos y transferir posteriormente los embriones resultantes en un ciclo diferido (105).

Por otro lado, en pacientes con riesgo de desarrollar síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) estaría también indicada la criopreservación de ovocitos o embriones con la consiguiente transferencia diferida. Se han desarrollado diferentes estrategias clínicas para abordar esta complicación que afecta a algunas pacientes durante su estimulación ovárica. Una de las más actuales consiste en la combinación del uso de agonistas de GnRH para desencadenar la ovulación y la vitrificación de los ovocitos obtenidos. Los resultados de un estudio de Herrero (106) muestran la eficacia de esta modalidad frente al coasting tradicional empleado para reducir el riesgo de SHO. Además de disminuir el riesgo para la paciente, se observa un aumento significativo en la tasa de embarazo al transferir los embriones en un ciclo posterior. Resulta interesante que en las pacientes sometidas a coasting se observó una mayor tasa de cancelación debido al riesgo de SHO o a la mayor incidencia de

embriones de mala calidad en estos casos. En este trabajo también resulta de interés que la tasa de supervivencia tras la desvitrificación era inferior a la publicada por el mismo grupo en ovocitos de donante. Esto confirmaría las sospechas de peor calidad ovocitaria en pacientes altas respondedoras. Uno de los aspectos más discutidos en relación a esta estrategia es la ventaja de vitrificar ovocitos o bien embriones, supuestamente con la misma finalidad. A la vista de los avances en la criopreservación embrionaria, no parecería necesario vitrificar ovocitos en lugar de embriones. Sin embargo, la criopreservación de ovocitos limita generar un exceso de embriones y congelar embriones que probablemente las pacientes no llegaran a transferirse nunca, sobretodo cuando hablamos de altas respondedoras. Con la vitrificación de ovocitos evitamos los problemas éticos asociados, especialmente en situaciones de conflicto como divorcio o separación, e incluso fallecimiento de uno de los miembros de la pareja (107)

Controversias actuales en la vitrificación

Una de las cuestiones más discutidas actualmente en relación a esta técnica son las medidas que deberían adoptarse en los laboratorios con el fin de eliminar el riesgo potencial de contaminación cruzada entre las muestras. La mayor parte de los laboratorios emplean dispositivos o soportes abiertos y eso conlleva que las células que se vitrifican entran en contacto directo con el nitrógeno líquido de los bancos donde permanecerán almacenadas hasta su utilización. La incertidumbre en torno a la seguridad de los sistemas empleados para criopreservar células surge ya en el año 1995 al conocerse la transmisión del virus de la hepatitis B a receptores de médula ósea que había permanecido almacenada en nitrógeno líquido contaminado (108). Se sabe que la mayoría de hongos, virus y bacterias son capaces de sobrevivir expuestos al nitrógeno líquido (109, 110, 111), por lo que debería utilizarse un sistema cerrado en cumplimiento además con las directivas europeas de almacenaje de células y tejidos (112). Y aunque hasta ahora todavía no ha sido probada la transmisión de virus entre embriones ni tampoco a pacientes a las que se hayan transferido embriones congelados (113, 114), el empleo de sistemas abiertos de almacenaje está muy cuestionado al creer que las células que se vitrifican entrarían en contacto directo con la posible fuente de contaminación que es el nitrógeno líquido. Se ha estudiado la transmisión de determinados virus bovinos a embriones vitrificados en un sistema abierto y almacenados en nitrógeno líquido. Estos estudios muestran que la mayoría de los agentes patógenos no son capaces de atravesar la zona pelúcida e infectar el embrión. Ni siquiera serían capaces de replicarse en la zona pelúcida, por lo que un

lavado adecuado del embrión tras la descongelación sería suficiente para eliminar los agentes patógenos adheridos a la zona pelúcida (109).

Un estudio reciente de Criado (115), utilizando un modelo experimental de nitrógeno líquido contaminado, muestra que los dispositivos cerrados son más seguros frente a los agentes patógenos. Sin embargo, la tasa de enfriamiento alcanzada al vitrificar con estos dispositivos es muy inferior a la que se logra con un dispositivo abierto (200°C/min frente a los >20.000 °C/min), y pese al creciente interés suscitado en torno al empleo de dispositivos cerrados, no hay estudios suficientes que validen este sistema y por tanto soportes como el Cryotip han sido reemplazados en el laboratorio por el Cryotop (116, 117). Actualmente existe un debate abierto sobre la eficacia clínica de los dispositivos cerrados frente a los abiertos. Grifo (83) publica resultados clínicos similares con ambos dispositivos y Paffoni confirma resultados significativamente inferiores al emplear un soporte cerrado de criopreservación (118). Bielanski en 2009 (119) introduce con buenos resultados un nuevo dispositivo cerrado consistente en pajuelas selladas en los extremos e impermeables a los patógenos. Los resultados son reproducibles y en 2011 Van Landuyt (79) publica tasas de supervivencia en blastocistos superiores al 90% utilizando dicho dispositivo cerrado. No hay duda de que estos resultados animan a introducir los dispositivos cerrados en la rutina clínica. Pese a la disminución en la velocidad de enfriamiento que acompaña a estos dispositivos cerrados, varios autores ya demuestran que esto no afectaría negativamente a la tasa de supervivencia, siempre y cuando la desvitrificación posterior vaya acompañada de elevada velocidad de calentamiento que compense el descenso en la velocidad de enfriamiento a la que previamente han sido sometidas las células (120, 121, 122).

Uno de los trabajos publicados más recientes es el de Stoop (123). Los autores muestran tasas de supervivencia de 90% en un estudio prospectivo realizado con ovocitos del programa de donación, confirmando así la eficacia de los sistemas cerrados y la seguridad o asepsia de los mismos frente a los dispositivos abiertos.

Otra estrategia para eliminar la contaminación cruzada sería el empleo de sistemas de almacenamiento en vapores de nitrógeno, evitando así el contacto directo de las muestras con el nitrógeno líquido. Teóricamente el riesgo de contaminación de los viales almacenados en vapor debería ser también menor puesto que el nivel de contaminantes ambientales en aire siempre es inferior al existente en fase líquida. Para algunos autores (124) los sistemas de almacenamiento en vapor no son homogéneos y su temperatura

se puede ver afectada por una amplia variedad de factores. Esto provoca el correspondiente impacto en las muestras almacenadas que, al estar vitrificadas en un reducido volumen, son especialmente susceptibles a calentamientos accidentales durante el almacenamiento. La eficacia de estos sistemas de vapor está demostrada tanto en la tasa de supervivencia de espermatozoides humanos (125) como embriones de ratón (126). En realidad no existen muchos trabajos que comparen ambos sistemas de almacenamiento en ovocitos y embriones humanos. Cobo (127) publica que las tasas de supervivencia y los resultados clínicos al almacenar en vapores de nitrógeno son similares a las tasas obtenidas con nitrógeno líquido. Sin embargo pese a que las muestras no se almacenan en nitrógeno líquido entran en contacto con el mismo durante la vitrificación. Y aunque la pureza del nitrógeno líquido esté certificada por el proveedor, está expuesto a riesgos de contaminación constantes desde su manufactura hasta la utilización en el laboratorio. Como alternativa a esta situación algunos autores sugieren el uso de nitrógeno líquido estéril durante la inmersión en nitrógeno del dispositivo que contiene los ovocitos o embriones, e incluso la posibilidad de esterilizarlo inmediatamente antes de su utilización. Se puede esterilizar mediante radiación ultravioleta, como recientemente ha sugerido Parmegiani (128) o mediante filtración del mismo (129). La emisión de radiación ultravioleta debe realizarse en condiciones adecuadas, a temperatura y tiempo controlados que permitan la eliminación de los microorganismos evitando la evaporación del nitrógeno (128). Parmegiani también propone combinar esta medida con el empleo de gobelets herméticos que garanticen una mayor seguridad al almacenar muestras criopreservadas, especialmente cuando se utilizan dispositivos abiertos (130).

Resultados perinatales

Los resultados perinatales y el seguimiento de los recién nacidos vivos (RNV) de las técnicas de reproducción asistida han constituido siempre un motivo de preocupación, especialmente cuando hablamos de técnicas novedosas. No siempre estas nuevas técnicas se introducen en los laboratorios con la cautela o prudencia aconsejable y pueden transcurrir varios años hasta poder valorar y descartar los efectos adversos de las mismas en los RNV (131). Al igual que ha sucedido con otras técnicas, hemos tenido que esperar hasta poder contar con estudios concluyentes sobre el efecto de la criopreservación en embriones y ovocitos humanos, y pese a ello, los estudios publicados son todavía muy escasos. Hasta la fecha ningún trabajo ha demostrado que la criopreservación incida negativamente en los resultados perinatales ni en la evolución de los RNV. No se han encontrado diferencias entre las tasas de malforma-

ción congénitas entre los niños nacidos de ciclos frescos y ciclos congelados. La mayoría de los estudios realizados incluyen ciclos de criopreservación de embriones, no ovocitos, y además utilizan el procedimiento tradicional de congelación lenta. En una revisión sistemática realizada por Wennerholm en 2009 (132) no se encuentran diferencias en los resultados perinatales, desde 1984 a 2008, tras congelación lenta y vitrificación tanto de ovocitos como de embriones. Varios trabajos basados en datos de registros de países escandinavos y de Australia también confirman que la criopreservación no afecta a los RNV en el peso, edad gestacional ni en tasa de malformaciones congénitas (133, 134, 135). El número de estudios realizado exclusivamente en niños procedentes de vitrificación de embriones y blastocistos es más reducido (136, 137, 138) y durante mucho tiempo ninguno de ellos ha incluido más de 150 niños. Kato (139) publica una serie muy amplia en 2011 tras estudiar un total de 6623 RNV de embarazos únicos y tampoco encuentra que la vitrificación de embriones aumente las incidencias durante el embarazo o malformaciones en los RNV. Un estudio más reciente de Shi (140) obtiene las mismas conclusiones en una serie más corta que estudia un total de 494 niños. Los resultados de todos estos trabajos no encuentran diferencias con respecto a los RNV de ciclos en fresco, sin embargo es importante considerar que la información con la que cuentan los autores en relación a la salud de los niños es bastante limitada en todos los casos. Con respecto a la criopreservación de ovocitos, Noyes publica el seguimiento a 900 niños nacidos tras congelación lenta de ovocitos y no encuentra diferencia con respecto a los nacidos con ovocitos frescos (141). Chian tampoco la encuentra al estudiar 200 niños concebidos con ovocitos vitrificados (142).

En conclusión, se precisan estudios controlados más a largo plazo y para ello evidentemente es necesario realizar un correcto control del embarazo y del seguimiento pediátrico de los niños nacidos a través de esta técnica.

BIBLIOGRAFIA

- Mazur P.** Freezing of living cells. Mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247, CI 25-CI42.
- Mazur P, Leibo S, Clui E.** A two factors hypothesis of freezing injure evidence from Chinese hamster tissue cells. *Exp Cell Res* 1972; 345-355.
- Meryman HT, Williams RT, Douglas MS.** Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 1977; 14: 287-302.
- Lovelock JE.** The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 10 (3): 414-426.
- Lovelock JE.** Biophysical aspects of the freezing and thawing living cells. *Proc R Soc Med* 1954; 47 (1): 60-62.
- Mazur P.** Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47: 347-369.
- Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW.** Temperature dependence of Kedem-Katchalsky membrane transport coefficients for mature mouse oocytes in the presence of ethylene glycol. 1999; 39: 169-176.
- Jones HW.** Cryopreservation and its problems. *Fertil Steril* 1990; 53: 780-784.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK.** Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004; 48: 146-156.
- Hunter J, Bernard A, Fuller B, et al.** Plasma membrane water permeabilities of human oocytes: the temperature dependence of water movement in individual cells. *J Cell Physiol* 1992; 150: 175-179.
- Mazur P.** Principles of cryobiology. In: Fuller B, Lane M, Benson E (eds). *Life in the frozen state*. CRC Press, New York, 2004; 4-55.
- Oktay K, Cil AP, Bang H.** Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006; 86: 70-80.
- Leibo SP.** Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. *J Membr Biol* 1980; 53: 179-188.
- Mazur P.** The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977; 14: 251-272.
- Hunter JE, Bernard A, Fuller B, et al.** Measurements of the membrane water permeability (L_p) and its temperature dependence (activation energy) in human fresh and failed-to-fertilize oocytes and mouse oocyte. *Cryobiology* 1992; 29: 240-249.
- Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, et al.** Viability of partially damaged human embryos alter cryopreservation. *Hum Reprod* 1997; 12: 2006-2010.
- Mazur P.** Slow-freezing injury in mammalian cells. *Ciba Found Symp* 1977; 19-48.
- Trad FS, Toner M, Biggers JD.** Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14: 1569-1577.
- Porcu E, Fabri R, Damiano G, et al.** Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 33-37.
- Fabri R, Porcu E, Marsella T, et al.** Human oocyte cryopreservation: new perspective regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001; 16: 411-416.
- Ashwood Smith MJ, Morris GW, Fowler R, et al.** Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum reprod* 1988; 3: 795-801.
- Hunter JE, Fuller BJ, Bernard A, et al.** Fertilization of human and mouse oocytes after exposure to low temperature and osmotic stress. *Cryobiology* 1990; 27: 647-648.
- Hunter JE, Bernard A, Fuller BJ, et al.** The osmotic response of human and mouse oocytes following cooling: evidence of altered morphological characteristics. *Cryo Lett* 1990; 11: 307-314.

24. **Sathananthan A, Trounson A, Freeman L, Brady T.** The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod* 1988; 3: 968-977.
25. **Albertini DF.** Regulation of meiotic maturation in the mammalian oocyte:interplay between exogenous cues and the microtubule cytoskeleton. *BioEssays* 1992; 14: 97-103.
26. **Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J.** Use of fluorescent in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 354-360
27. **Bianchi V, Coticchio G, Fava L, et al.** A meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2005; 20: 1078-1083.
28. **Coticchio G, De Santis L, Rossi G, et al.** Sucrose concentration influences the rate of human oocyte with normal spindle and chromosome configuration after slow cooling cryopreservation. *Hum Reprod* 2006; 21: 1771-1776.
29. **Nottola SA, Macchiarelli G, Coticchio G, et al.** Ultrastructural of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. *Hum Reprod* 2007; 22: 1123-1133.
30. **Ludwig M, Al-Hasani S, Felberbaum R, et al.** New aspects of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and future perspectives. *Hum Reprod* 1999; 14: 162-185.
31. **Chen C.** Pregnancies after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; 1: 884-886.
32. **Goud A, Goud P, Qian C, et al.** Cryopreservation of human germinal Vehicle stage in Vitro matured MII oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilizations, and early cleavage divisions. *Fertil Steril* 2000; 74: 487-494.
33. **Paynter SJ, Borini A, Bianchi V, et al.** Volume changes of mature human oocytes on exposure to cryoprotectant solutions used in slow cooling procedures. *Hum Reprod* 2005; 20: 1194-1199.
34. **Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, et al.** Birth of healthy female alter intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997; 68: 724-726.
35. **Gook DA, Schiewe M, Osborn SM, et al.** Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1995; 10: 2637-2641.
36. **Levi PE, Albani E, Novara PV, et al.** Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2006; 21: 370-375.
37. **Borini A, Sciajno R, Bianchi V, et al.** Clinical outcome of oocyte cryopreservation alter slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2006; 21: 512-517.
38. **Boldt J, Cline D, McLaughlin D.** Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2003; 18: 1250-1255.
39. **Azambuja RM, Badalotti M, Okada L, et al.** Results of oocyte cryopreservation using choline-based freezing medium. *Fertil Steril* 2005; 84: Suppl 1. September S178.
40. **Jain JK, Francis MM, Bayrak A, et al.** Pregnancy outcome alter cryopreservation of all oocytes from a single ovulatory cohorte: a prospective clinical trial. *Fertil Steril* 2005; 84: S350.
41. **Petracco A, Azambuja RM, Okada L, et al.** Comparison of embryo quality between sibling embryos originating from frozen or fresh oocytes. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 497-503.
42. **Boldt J, Tidswell N, Sayers A, et al.** Human oocyte cryopreservation: 5-years experience with a sodium-depleted slow freezing method. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 96-100.
43. **Bianchi V, Coticchio G, Distratis V, et al.** A differential sucrose concentration during dehydration (0.2mol/l) and rehydration (0.3mol/l) increases the implantation rate of frozen human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 64-71.
44. **De Santis L, Cini I, Coticchio G, et al.** Objective evaluation of the viability of cryopreserved oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007; 15: 338-345.
45. **Azumbaje R, Petracco A, Okada L, et al.** Experience of freezing human oocytes using sodium-depleted media. *Reprod Biomed Online* 2011; 22: 83-87.
46. **Bianchi V, Lappi M, Bonu MA, et al.** Oocyte slow freezing using a 0.2-0.3M sucrose concentration protocol: is it really the time to trash the cryopreservation machine? *Fertil Steril* 2012; 97: 1101-1107.
47. **Smith GD, Motta EE, Serafini P.** Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 298-306.
48. **Rall W, Fahy G.** Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-575.
49. **Nakagata N.** High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 479-483.
50. **Fahy GM.** The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 23: 1-13.
51. **Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, et al.** Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 623-633.
52. **Fuller B, Paynter S.** Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 680-691.
53. **Vajta G, Holm P, Kuwayama M, et al.** Open Pulled Straws (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-58.
54. **Hong SW, Chung HM, Lim JM, et al.** Improved human oocyte development alter vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999; 72: 142-146.
55. **Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, et al.** Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999; 14: 3077-3079.
56. **Chung HM, Hong SW, Lim JM, et al.** In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* 2000; 73: 545-551.
57. **Vajta G, Nagy ZP.** Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 779-796.
58. **Chen SU, Lien YR, Chen HF, et al.** Open Pulled straws for vitrification of mature oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum Reprod* 2000; 15: 2598-203.

59. **Liebermann J, Tucker M, Graham J, et al.** Blastocyst development after vitrification of multipronucleated zygotes using the flexible denuding pipette (FDP). *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 148-152.
60. **Papis K, Shimizu M, Izaike Y.** Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000; 15: 651-658.
61. **Park SP, Kim DI, Oh JH, et al.** Ultrarapid freezing of human multipronucleated zygotes using electron microscope grids. *Hum Reprod* 2000; 17: 1787-1790.
62. **Yerman RP, Gerami-Naini B, Mitalipov S, et al.** Cryoloops vitrification yields superior survival of rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod* 2001; 16: 1965-1969.
63. **Mukaida T, Takahashi K, Kasai M.** Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 221-225.
64. **Chian RC, Son WY, Huang JY, et al.** High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertil Steril* 2005; 84, S36.
65. **Nakashima A, Ino N, Kusumi M, et al.** Optimization of a novel nylon mesh container for human embryo ultrarapid vitrification. *Fertil Steril* 2010; 7: 2405-2410.
66. **Kuwayama M, Vajta G, Kato O, et al.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300-308.
67. **Kuwayama M.** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67: 73-80.
68. **Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, et al.** Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008; 89: 1657-1664.
69. **Cobo A, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A.** Use of a cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized controlled clinical trial. *Hum Reprod* 2010; 25: 2239-2246.
70. **Rienzi L, Romano S, Albricci L, et al.** Embryo development of fresh "versus" vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010; 25: 66-73.
71. **Martinez-Burgos M, Herrero L, Megías D, et al.** Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2011; 95: 374-377.
72. **Coticchio G, Scianjino R, Hutt K, et al.** Comparative analysis of the metaphase II spindle of human oocytes through polarized light and high performance confocal microscopy. *Fertil Steril* 2010b; 93: 2056-2064.
73. **Cheng SU, Yang YS.** Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *J. Obstet. Gynecol.* 2009; 48: 15-22.
74. **Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, et al.** Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril* 2009; 91: 2399-2407.
75. **Nottola SA, Coticchio G, Scianjino R, et al.** Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. *Reprod Biomed Online* 2009; 19: 17-27.
76. **García JI, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L.** Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Hum Reprod* 2011; 0: 1-9
77. **Lieberman J, Tucker M.** Comparison of vitrification and conventional cryopreservation on day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 2006; 86: 20-26.
78. **Stachecki J, Garrisi J, Sabino S, et al.** A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 360-367.
79. **Van Landuyt L, Stoop D, Verheyen G, et al.** Outcome of closed blastocyst vitrification in relation to blastocyst quality: evaluation of 759 warming cycles in a single-embryo transfer policy. *Hum Reprod* 2011; 26: 527-533.
80. **Zhu D, Zhang J, Cao S, et al.** Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles-time for a new embryo transfer strategy?. *Fertil Steril* 2011; 95: 1691-1695.
81. **Kim TJ, Laufer LR, Hong SW.** Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women. *Fertil Steril* 2010; 93: 467-474.
82. **Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, et al.** Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril* 2010; 94: 2088-2095.
83. **Grifo JA, Noyes N.** Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril* 2010; 93: 391-396.
84. **Jemal A, Siegel R, Ward E, et al.** Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249.
85. **Knopman JM, Papadopoulos E, Grifo J, et al.** Surviving childhood and reproductive-aged malignancy: effects on fertility and future parenthood. *Lancet Oncol* 2010; 11: 490-498.
86. **American Society of Reproductive Medicine.** Practice Committee response to Rybak and Lieman: elective self-donation of oocytes. *Fertil Steril* 2009; 92: 1513-1514.
87. **Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, et al.** Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2010; 93: 268.e11-268.e13.
88. **Oktay K, Karlikaya G.** Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000; 242: 1919.
89. **Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, et al.** Monitoring the ovaries after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: endocrine studies, in vitro fertilization cycles, and live birth. *Fertil Steril* 2007; 87: 418.e7-418.e15.
90. **Kim SS, Lee WS, Chung MK, et al.** Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. *Fertil Steril* 2009; 91: 2349-2354.

91. Silber SJ, Grudzinskas G, Gosden RG. Successful pregnancy after microsurgical transplantation of an intact ovary. *N Engl J Med* 2008; 359: 2617-2618.
92. Tryde Schmidt K, rosendahl M, Ernst E, et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in 12 women with chemotherapy-induced premature ovarian failure; the Danish experience. *Fertil Steril* 2011; 95: 695-701.
93. Cobo A, Domingo J, Pérez S, et al. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 268-273.
94. Noyes N, Labella PA, Grifo J, et al. Oocyte cryopreservation: a feasible preservation option for reproductive age cancer survivors. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 495-499.
95. Noyes N, Knopman J, Melzer K, et al. Oocyte cryopreservation as a fertility preservation measure for cancer patients. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 323-333.
96. Quintero RB, Helmer A, Huang JQ, et al. Ovarian stimulation for fertility preservation in patients with cancer. *Fertil Steril* 2010; 93: 865-868.
97. Shalom-Paz E, Almog B, Shehata F, et al. Fertility preservation for breast-cancer patients using IVM followed by oocyte or embryo vitrification. *Reprod Biomed Online* 2010; 21: 566-571.
98. Lockwood G. Social egg freezing: the prospect of reproductive "immortality" or a dangerous delusion?. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 334-340.
99. Shenfield F, Pennings G, Cohen J, et al. ESHRE Task Force on Ethics and Law 7: ethical and considerations for the cryopreservation of gametes and reproductive tissues for self use. *Hum Reprod* 2004; 19: 460-462.
100. Dondorp W, de Wert G, Pennings, et al. ESHRE Task Force on Ethics and Law. Oocyte cryopreservation for age-related fertility loss. *Hum Reprod* 2012; 27: 1231-1237.
101. Cobo A, Remohí J, Chang C, et al. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 341-346.
102. Cobo A, Garrido N, Crespo J, et al. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online* 2012; 24: 424-432.
103. Bosch E, Valencia I, Escudero E, et al. Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2003; 80: 1444-1449.
104. Melo MA, Meseguer M, Garrido N, et al. The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme. *Hum Reprod* 2006; 21: 1503-1507.
105. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, et al. Embryo cryopreservation rescues cycles with premature luteinization. *Fertil Steril* 2010; 93: 636-641.
106. Herrero L, Pareja S, Losada C, et al. Avoiding the use of human chorionic gonadotropin combined with oocyte vitrification and GnRH agonist triggering versus coasting: a new strategy to avoid ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2011; 95: 1137-1140.
107. García-Velasco JA. Agonist trigger: what is the best approach? Agonist trigger with vitrification of oocytes or embryos. *Fertil Steril* 2012; 97: 527-528.
108. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346: 137-140.
109. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, et al. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000; 40: 110-116.
110. Bielanski A, Bergeron H, Lau P, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003; 46: 146-152.
111. Letur-Konirsch H, Collin G, Sifer C, et al. Safety of cryopreservation Strauss for human gametes or embryos: a study with human immunodeficiency virus-1 under cryopreservation conditions. *Hum Reprod* 2003; 18: 140-144.
112. European Union Tissues and Cell Directives. Directive /187/CE de la Commission du 8 février 2006. *Journal officiel de l'Union européenne* 2006; 38: 51.
113. Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J, et al. Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil Steril* 2010; 94: 1181-1188.
114. Cobo A, Bellver J, de los Santos MJ, Remohí J. Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2012; 97: 74-78.
115. Criado E, Moalli F, Polentarutti N, et al. Experimental contamination assessment of a novel closed ultravitrification device. *Fertil Steril* 2011; 95: 1777-1779.
116. Kuwayama M, Vajta G, Leda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005a; 11: 608-614.
117. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, et al. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum Reprod* 2005; 20: 492-496.
118. Paffoni A, Guarneri C, Ferrari S, et al. Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011; 22: 292-298.
119. Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod* 2009; 24: 697-699.
120. Kuleshova LL, Shaw JM. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Hum Reprod* 2000; 15: 2604-2609.
121. Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 2009; 59: 75-82.
122. Isachenko V, Katkov I, Yakovenko S, et al. Vitrification of human laser treated blastocysts within cut standard straws (CSS): novel

-
- aseptic packaging and reduced concentrations of cryoprotectants. *Cryobiology* 2007; 54: 305-309.
- 123. Stoop D, De Munck N, Jansen E, et al.** Clinical validation of a closed vitrification system in an oocyte-donation programme. *Reprod Biomed Online* 2012; 24: 180-185.
- 124. Stachecki JJ, Cohen J.** An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 152-163.
- 125. Saritha KR, Bongso A.** Comparative evaluation of fresh and washed human sperm cryopreserved in vapor and liquid phases of liquid nitrogen. *J Androl* 2001; 22: 857-862.
- 126. Eum JH, Park JK, Lee WS, et al.** Long-term liquid nitrogen vapour storage of mouse embryos cryopreserved using vitrification or slow cooling. *Fertil Steril* 2009; 5: 1928-1932.
- 127. Cobo A, Romero JL, Pérez S, et al.** Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril* 2010; 94: 1903-1907.
- 128. Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, et al.** Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril* 2010; 94: 1525-1528.
- 129. Cobo A.** Personal Communications, Cryo Congress, Valencia, Spain, 2010.
- 130. Parmegiani L, Rianzi L.** Hermetical goblets for cryostorage of human vitrified specimens. *Hum Reprod* 2011; 26: 3204-3205.
- 131. Garrido N, Pellicer A, Niederberger C.** Testing the water before swimming: satisfying the need for clinical trials of devices, media, and instruments before their use in assisted reproduction laboratories. *Fertil Steril* 2012; 97: 245-246.
- 132. Wennerholm, UB, Soderstrom-Anttila V, Bergh C, et al.** Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum Reprod* 2009; 24: 2158-2172.
- 133. Pelkonen S, Koivunen R, Gissler M, et al.** Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995-2006. *Hum Reprod* 2010; 25: 914-923.
- 134. Pinborg A, Loft A, Aaris Henningsen AK, et al.** Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryos replacement: the Danish National Cohort Study 1995-2006. *Fertil Steril* 2010; 94: 1320-1327.
- 135. Wang YA, Sullivan EA, Black D, et al.** Preterm birth and low birth weight alter assisted reproductive technology-related pregnancy in Australia between 1996 and 2000. *Fertil Steril* 2005; 83: 1650-1658.
- 136. Wikland M, Hardarson T, Hillensjo T, et al.** Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2010; 25: 1699-1707.
- 137. Takahashi K, Mukaida T, Goto T, et al.** Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril* 2005; 84: 88-92.
- 138. Rama Raju GA, Jaya Prakash G, Murali Krishna K, et al.** Neonatal outcome after vitrified day 3 embryo transfers: a preliminary study. *Fertil Steril* 2009; 92: 143-148.
- 139. Kato O, et al.** Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol* 2011; doi: 10.1016/j.ejogrb.2011.12.005.
- 140. Shi W, Xue X, Zhang S, et al.** Perinatal and neonatal outcomes of 494 babies delivered from 972 vitrified embryo transfers. *Fertil Steril* 2012; In Press.
- 141. Noyes N, Porcu E, Borini A.** Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 769-776.
- 142. Chian RC, Huang JYJ, Lin Tan S, et al.** Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 608-610.