

## El número de vitrificaciones no afecta a la viabilidad de un embrión: A propósito de un caso

### Case report: Re-vitrification of human embryos does not affect human embryo viability

Migueles Beatriz.<sup>1</sup>, Hebles Maria<sup>2</sup>, , Dorado Mónica.<sup>1</sup>, , González Mercedes<sup>1</sup>, Aguilera Laura<sup>1</sup>, Sánchez Pascual<sup>2</sup>, Sánchez Fernando<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Fundación Guadalquivir de Investigación Médica. Sevilla

<sup>2</sup>. Clínica Ginemed. Sevilla

#### RESUMEN

**OBJETIVO:** Caso práctico en el que se obtiene embarazo de un embrión que ha sido vitrificado dos veces en diferentes estadios de división.

**DISEÑO:** Caso clínico.

**PACIENTE(S):** Pareja que acude al centro por una esterilidad 1ª de dos años de duración. El caso se indica para ICSI por una Asteno-Terato severa. Se realiza el ciclo y se obtienen un total de 11 embriones .

**RESULTADO:** Se logra embarazo en la 4ª transferencia, de un embrión que ha sido vitrificado dos veces.

**CONCLUSIÓN:** La vitrificación es el método de criopreservación embrionaria que ofrece mejores resultados tanto a nivel de supervivencia, evolución y embarazo sin ocasionar ningún cambio en la calidad del mismo

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2011; 29: 57-61 ©2012 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

**Palabras clave:** *Vitrificación, supervivencia, viabilidad.*

#### SUMMARY

**OBJECTIVE:** Case study where pregnancy is achieved with an embryo that had been twice-vitrified at different stages of development.

**DESIGN:** Case report.

**PATIENT (S):** Couple with primary infertility of 2 years duration. ICSI is performed due to severe asthenoteratozoospermia. A total of 11 embryos were obtained.

**RESULT:** Pregnancy achieved after the 4th transfer attempt with a twice-vitrified embryo.

**CONCLUSION:** Vitrification is the embryo cryopreservation method that offers the highest survival, development and pregnancy rates, with no damage to the embryo

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2012; 29: 57-61 ©2012 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

**Key words:** *Vitrification, survival, viability.*

Aceptado 13 Diciembre 2011

Correspondencia: Beatriz Migueles Pastor. C/ Farmacéutico Murillo Herrera nº 3 Bajo. 41010 Sevilla, España.

bmigueles@ginemed.es

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

## INTRODUCCIÓN

Se define la vitrificación como el proceso físico de solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo(1). Desde la publicación de los primeros resultados tras la criopreservación embrionaria mediante vitrificación (2) la técnica ha pasado de ser experimental a ser el método de elección en la mayoría de los centros de reproducción. Los excelentes resultados publicados por diferentes grupos (3, 4, 5) nos animó a poner en marcha el protocolo obteniendo resultados similares (6). Tras una experiencia de tres años con resultados de supervivencia por encima del 90% , una tasa de evolución posterior cercana al 80% y una tasa de embarazo en transfer superior al 40% exponemos el siguiente caso en el que describimos el embarazo obtenido en una paciente en la que el embrión que dio lugar al embarazo fue vitrificado por dos veces.

## INFORME DEL CASO:

Pareja de 28 y 34 años que acudió a nuestro centro con una esterilidad 1ª de dos años de duración. Ella presentaba niveles hormonales en día 2-3 del ciclo dentro de la normalidad. El varón presentaba Asteno- Terato severa por lo que se les indicó para ICSI. Se sometió a la paciente a una estimulación ovárica controlada se realizó en protocolo largo insertado en ciclo de ACHO (anticonceptivos hormonales orales; Edelsin: Effik) con agonistas de la GnRH por vía nasal, Nafarelina (Synarel® Seid. Barcelona) a dosis de una inhalación de 200 µgr cada 12 horas desde diez días antes de dejar los anticonceptivos. Una vez comprobado el reposo ovárico y cuando se produjo la deprivación (regla), se comenzó la estimulación con goandotrofinas en protocolo COMBO, con HMG urinaria (HMG Pharma Lepori S.A) y FSHr (Gonal f; Laboratorios Merck-Serono, Madrid), a dosis fijas de 150 y 150 UI. La punción ovárica para la recuperación ovocitaria se realizó en día 12 de ciclo previa maduración final con 10.000 UI de hCG (hCG Pharma Lepori S.A ) 36 horas antes de la misma. Como se esperaba una recuperación superior a los 25 ovocitos, se pautaron agonistas dopaminérgicos a dosis de 2,5 mg diarios de Bromocriptina (Parlodel 2.5, MEDA Pharma S.A.U) durante 7 días desde el día de la administración de la hCG, AAS 100 mg, reposo e hidratación. La evolución de la paciente fue satisfactoria, manejándose el cuadro dentro de un contexto de SHO de carácter leve-moderado, no requiriendo medidas especiales.

Se obtuvieron 36 ovocitos de los que se pudieron microinyectar 25 MII y se obtuvieron un total de 11 fecundaciones normales. Los embriones se dejaron evolucionar hasta día +2 post puncion. El cultivo se realizó en medio secuencial Sage (Sage, Trumbull, CT) y los embriones se vitrificaron

FIGURA 1

### TIPO A/TIPO A

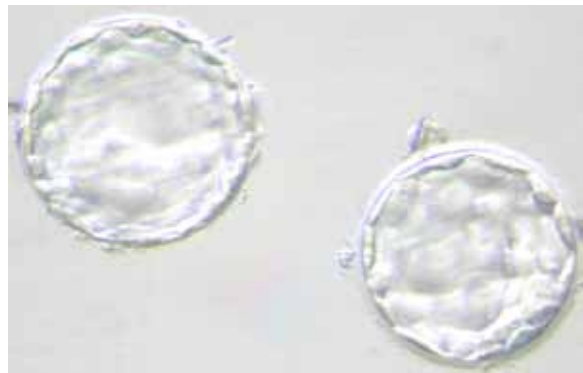
Primera transferencia: tras la 1ª desvitrificación, se pasan 2 embriones tipo A equivalentes a un día 3 de división. El resto se dejan evolucionar y se revitrifican un blasto tipo C y un blasto tipo D



FIGURA 2

### 2 BLASTOS TIPO A

Segunda transferencia: tras la segunda desvitrificación de embriones en +2 y posterior cultivo se transfieren dos blastos tipo A equivalentes a un 5º día de desarrollo. Se vitrifican 3 blastos restantes



en día +2 por riesgo de SHO mediante el método del cryotop (3), (6).

Al mes siguiente de la punción ovárica, se preparó el ciclo para la transferencia de embriones vitrificados. Se desvitrificaron 6 embriones, sobrevivieron los 6 y se dejaron un día en cultivo para poder observar su evolución post-desvitrificación. Evolucionaron 5 de los 6 embriones y se transfieren 2 embriones de óptima calidad (Tipo A, según los criterios de Asebir). El endometrio presentaba un grosor de 12mm. Los embriones restantes se dejaron evolucionar

FIGURA 3

**BLASTO TIPO C Y BLASTO TIPO D**

Tercera transferencia: embriones evolutivos tras la segunda desvitrificación y posterior revitrificación se transfieren dos blastos; un tipo C y un tipo D

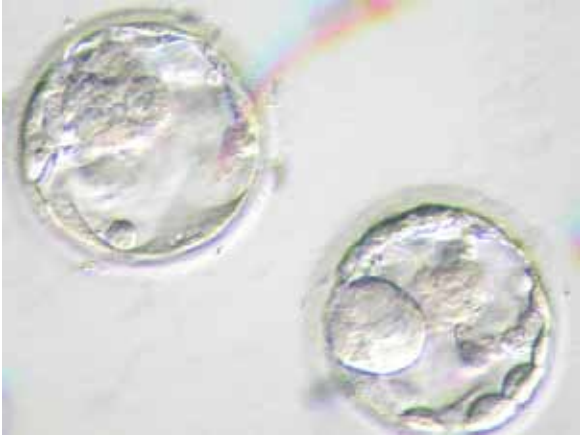


FIGURA 4

**B1 TIPO D**

Cuarta transferencia: tras la primera desvitrificación. Se desvitrifican los dos blastos revitrificados y sobrevive 1 de ellos (tipo D), se transfiere.



dos días más y se vitrificaron: un blasto Tipo B y un blasto Tipo D. El resultado de la  $\beta$ -HCG en sangre a los 12 días tras la transferencia fue negativo. Al mes siguiente se programó una nueva transferencia de embriones vitrificados para la que se desvitrificaron los 5 embriones restantes de la vitrificación en día +2. Sobreviven a la desvitrificación

perfectamente y se dejan evolucionar durante tres días; se transfieren 2 blastos Tipo A. El endometrio midió 14 mm

Se volvieron a vitricular los tres embriones restantes: 2 blastos Tipo C y otro Tipo D. Se realizó la  $\beta$ -HCG a los 11 días, y el resultado fue negativo. A los tres meses se volvió a programar una tercera transferencia. Se desvitrificaron y sobrevivieron dos de los tres embriones, se transfirieron ambos. En este caso el grosor endometrial fue de 12mm No hubo embarazo.

Dos meses después de la última transferencia se programa una nueva desvitrificación de los dos embriones que quedan vitrificados. Se desvitrifican los dos y sobrevivió sólo el blasto Tipo D de la segunda vitrificación). El endometrio midió 13 mm.

**RESULTADO:**

El embrión fue transferido. Se realizó la  $\beta$ -hCG a los 11 días post-transfer y se obtuvo un valor de 1918 mUI. El embarazo cursó con normalidad. La paciente dio a luz el pasado mes de octubre un varón de 3.450gr.

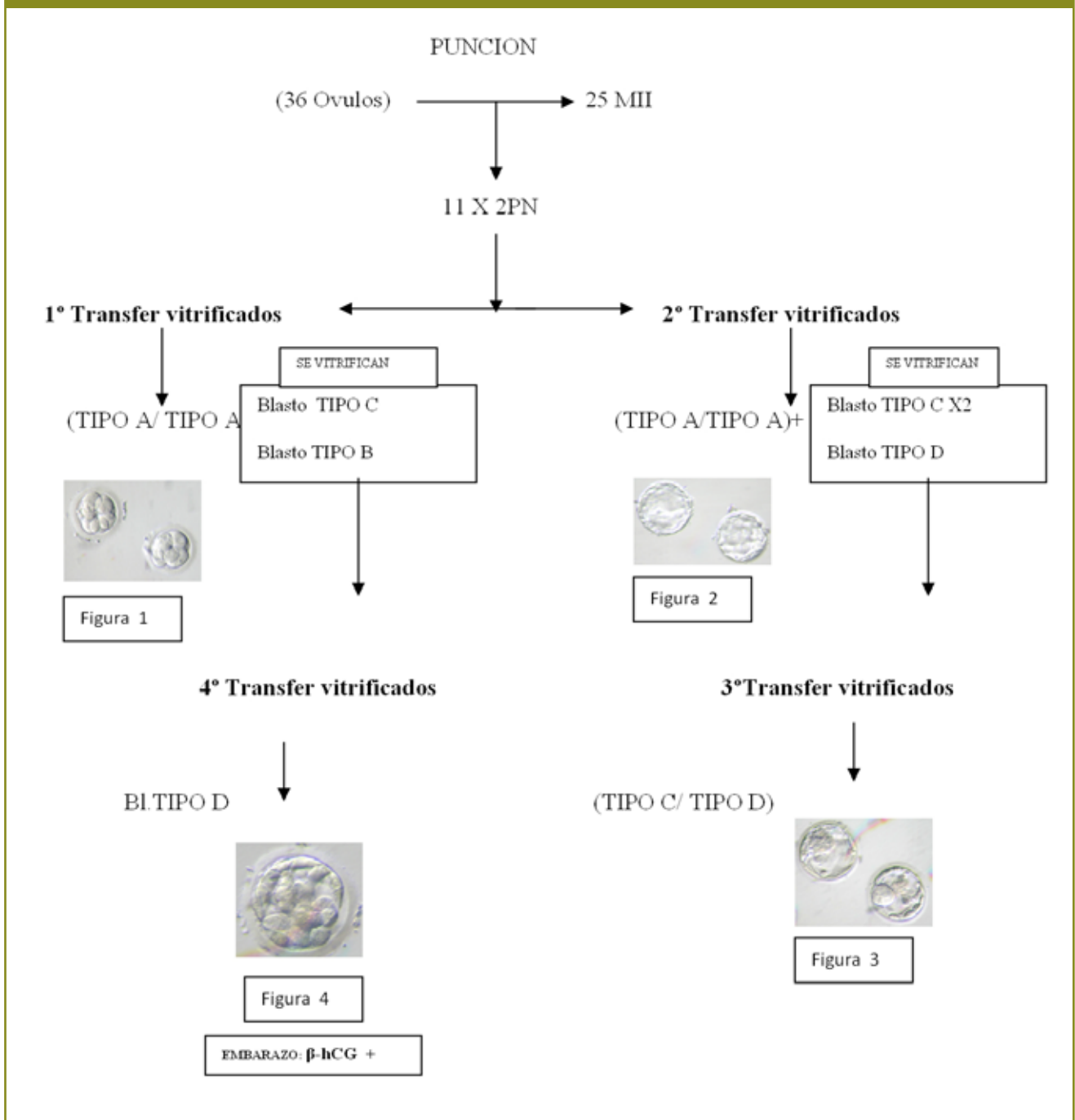
**RESUMEN:**

(Ver figura resumen)

**DISCUSION:**

La consolidación de la vitrificación como técnica de criopreservación embrionaria es reciente si consideramos que los primeros protocolos fueron publicados en el año 1985(2), donde se describe la primera vitrificación exitosa de embriones murinos en estadio de 8 células. Sin embargo, no se publica la primera vitrificación exitosa en humanos hasta el año 1998(7). Así podemos justificar los recelos iniciales frente a la aplicación de la técnica por las elevadas concentraciones de crioprotector utilizadas y por el contacto con el nitrógeno, es por esto que el camino para poner a punto el protocolo adecuado no fue fácil y el proceso fue ensayado por diferentes grupos de investigación durante varios años (9), ya que la técnica fue probada en diferentes modelos animales antes de ser usada definitivamente en humanos(7). La vitrificación se presenta como alternativa a la congelación lenta por la eliminación del daño que los cristales de hielo producen en el interior de las células cuando criopreservamos mediante congelación lenta (9). Una vez la técnica se popularizó, fueron numerosos los trabajos publicados con los buenos resultados tanto en óvulos, embriones y blastocistos (3)(4)(5)(7)(8)(10)(11). Por otro lado, existen pocos casos documentados en los que se hayan ob-

FIGURA RESUMEN



tenido embarazos tras más de una vitrificación, así en el año 2008 Ching-Chien et al (12) publicó dos casos en los que obtiene embarazo de blastocistos desvitrificados obtenidos tras la fecundación de óvulos vitrificados de donante y cultivo a blastos. No obtuvieron embarazo en las trasferencias de los blastocistos en fresco y si en las trasferencias tras

desvitrificar dichos blastos excedentes en ambos ciclos. Peng en 2011(13) describe un embarazo a termino en un blastocisto evolucionado a día +5 tras dos biopsias realizadas al embrión en día +3 sobre blastómeras y en día +5 en estadio de Blastocisto sobre el trofoectodermo. El embrión es vitrificado posteriormente y transferido en un ciclo

posterior obteniéndose embarazo. Así, las elevadas tasas de supervivencia descritas en los diferentes trabajos consultados dan lugar a resultados positivos en embriones en los que a priori no habríamos pensado como describe Kenichiro 2009 (14) donde describe el caso en el que revitrifica un embrión que queda en cultivo tras desvitrificar y que en el día +6 presenta estadio de mórula y sin embargo en +7 es un blasto que ha realizado el hatching espontáneo de forma completa. Este embrión se vitrifica sin zona pelúcida y sobrevive en perfectas condiciones a la desvitrificación. Tras su transferencia con unas condiciones endometriales de día +5, la beta es positiva y el embarazo llega a término.

Desde la introducción de la vitrificación en nuestro centro en Enero de 2007, los resultados obtenidos en tasas de supervivencia, evolución y embarazo han sido muy superiores a las que teníamos por la criopreservación mediante congelación lenta (6). Estos resultados nos ha permitido desde entonces un manejo más versátil de los ciclos donde al no perder la calidad de los embriones que se preservan podemos disminuir el número de embriones a los que someter a desvitrificación e incluso la programación de transferencias de blastocistos tras ser desvitrificados, obteniendo los mismos resultados que en fresco (8). Por otro lado, en pacientes indicadas para un Diagnóstico Genético Preimplantacional, la vitrificación de embriones en día +2 ó de ovocitos en pacientes de baja respuesta es otra estrategia a seguir ya que al criopreservar los embriones ó los ovocitos tras más de una estimulación ovárica (15), podemos conseguir un número adecuado de embriones para realizar este diagnóstico con un mejor pronóstico al contar con un mayor número de embriones. Asimismo, la vitrificación es la mejor opción, en ciclos como el descrito, en los que la paciente presenta SHO (Síndrome de Hiperestimulación Ovárica) ya que la transferencia diferida no entraña ningún riesgo para la paciente y el resultado es igualmente satisfactorio.

## CONCLUSIÓN:

Con el resultado obtenido en este caso, podemos concluir que el mismo embrión puede ser sometido a más de una vitrificación y que dicho proceso no compromete ni su capacidad de supervivencia, ni de división, ni de implantación. Basándonos en nuestra experiencia podemos justificar el uso de la técnica como único método de criopreservación de ovocitos y embriones en cualquiera de sus estadios de división

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Vajta, G; Kuwayama, M. 2006.** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65:236-244.
2. **Rall, W.F Fahy, G.M 1985.** Ice-free criopreservación of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.
3. **Kuwayama M. 2006.** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. *Theriogenology* 67.(2007) 73-80.
4. **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 2007.** Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the cryotop method. In press
5. **Lucena E. Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A.** Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85: 108-11
6. **Miguelés B, Dorado M, Hebles M, González M, Duvison L, Nuñez G, Sánchez P, Sánchez F.** The vitrification: New age en criopreservación embrionaria. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Vol. 26 nº6 Nov-Dic 2009. 483-487.
7. **Mukaida, T.; Wada, S.; Takahashi, K.; Pedro, P.B.; An, T.Z.; Kasai, M. 1998.** Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Human Reproduction*, 13: 2874-2879.
8. **Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C.** Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril* 2005; 84: 88-92
9. **Pedro Cabrera, Adriana Fernández, Pedro Bastidas, Magaly Molina, Angélica Bethencourt and Thais Díaz.** Vitrification: An Embryo Cryopreservation Alternative. *Rev. Fac. Cienc. Vet.* Vol 47 nº1 Maracay June 2006
10. **Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A., Iarman M.G., Hamilton R. Gardner D. K.** A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod* 2008;23:1976-1982.
11. **Liebermann J. Tucker Michael J.** Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 2006; 86: 20-26
12. **Ching-Chien Chang, Daniel B. Shapiro, Diana Patricia Bernal, Graham Wright, Hilton I Kort, Zsolt Peter Nagy.** Two successful pregnancies obtained following oocyte vitrification and embryo re-vitrification.. *RBMonline*. Vol 16 nº 3.2008 346-349.
13. **Peng W, Zhang J, Shu Y.** Live birth after transfer of a twice-vitrified warmed blastocyst that had undergone trophectoderm biopsy. *RBMonline* Vol 11 Mar;22(3):299-302.
14. **Kenichiro H., Kaori H., Toshitaka H., Tomoyo K., Shinichiro O., Masayuki K., Kazuo K.** Case report: successful delivery following the transfer of a human re-vitrified day-7 spontaneously hatched blastocyst developed from vitrified cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet* (2009) 26:405-409
15. **Ana Cobo1, José Bellver, Javier Domingo, Sonia Pérez, Juana Crespo, Antonio Pellicer, José Remohí.** News options in assisted reproduction technology: The cryotop method of oocyte vitrification. *RBMonline* 2008 Vol 17 Jul (1): 68-72