



REPORTE DE CASO

PRIMERA GESTACIÓN LOGRADA A PARTIR DE ÓVULOS HUMANOS VITRIFICADOS

FIRST PREGNANCY ACHIEVED FROM HUMAN VITRIFIED OOCYTES

*Elkin Lucena, M.D, BMR**, *Diana Patricia Bernal, MV, BMR***, *Carolina Lucena, BS, BMR****, *Alejandro Rojas, M.D.†*, *BMR*, *Sandra Mojica, BS, BMR††*, *Ángela María Saa, BS, BMR††*, *Zulma Suárez, BS, BMR§*, *Abby Morán, Ps, BMR§§*.

Recibido: septiembre 16/2004 – Revisado: septiembre 29/2004 – Aceptado: septiembre 30/2004

RESUMEN

La vitrificación de óvulos humanos tiene múltiples aplicaciones y demostró ser altamente efectiva en el manejo de una paciente con síndrome de hiperestimulación ovárica que se encontraba en tratamiento para infertilidad secundaria.

Objetivo: mostrar la eficiencia de la vitrificación de oocitos aplicada a óvulos en metafase II (MII) de una mujer con síndrome de hiperestimulación ovárica.

Procedimiento: se vitrificaron óvulos MII de una paciente con síndrome de hiperestimulación ovárica, para lo cual se utilizó la técnica *cryotop* y como agentes crioprotectores etilenglicol, dimetil-sulfóxido (DMSO) y sacarosa. Dos meses después, una vez restablecida a la normalidad la condición clínica de la paciente, se desvitrificaron los óvulos, se utilizó la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y 24 horas más tarde se evaluó fertilización, los cigotos obtenidos se cultivaron *in vitro* por 72 horas hasta el momento de la transferencia embrionaria intrauterina.

Resultados: la técnica de vitrificación con *cryotop* demostró ser una herramienta efectiva para preservar óvulos en lugar de embriones, además de disminuir los problemas éticos, morales, legales y religiosos que ésta conlleva.

Conclusiones: la vitrificación por *cryotop* proporciona altas tasas de supervivencia, fertilización, desarrollo embrionario y embarazo; así mismo, ofrece una nueva alternativa para el manejo del síndrome de hiperestimulación ovárica.

Palabras clave: oocito, vitrificación, supervivencia, viabilidad, gestación, ICSI, criopreservación, criobanco.

SUMMARY

Among its multiple applications, vitrification of human oocytes has demonstrated to be highly effective in the handling of a patient with OHSS, who was under treatment for secondary infertility.

Objective: to demonstrate the efficiency of oocyte vitrification applied to metaphase II oocytes (MII), of women presenting OHSS.

Procedure: MII oocytes from a patient with OHSS were vitrified, using the *cryotop* technique with ethylenglycol, dimethylsulfoxide, and sucrose as cryoprotectants agents. Two months after, once the clinical stage of the patient was normalized, the oocytes were thawed and underwent ICSI; 24 hours later, fertilization was evaluated and zygotes were

Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad – CECOLFES LTDA. Bogotá – Colombia.

* Director Científico. Correo electrónico: cecolfes@colomsat.net.co

** Directora Programa Madres del Futuro.

*** Directora División de Investigación y Desarrollo.

† Ginecólogo.

†† Embrióloga.

§ Directora Programa Ovulo Donado.

§§ Coordinadora de Pacientes.

maintained under *in vitro* culture conditions during 72 hours, time of intrauterine embryo transfer.

Results: vitrification technique with *cryotop* demonstrated to be an effective tool for preservation of oocytes instead of freezing embryos due to all the ethical, moral, legal and religious points of view concerning preservation.

Conclusions: vitrification with *cryotop* provides high rates of survival, fertilization, embryo development and ongoing normal pregnancies, offering a new alternative for handling OHSS.

Key words: oocyte, vitrification, survival, viability, pregnancy, ICSI, cryopreservation, cryobank.

INTRODUCCIÓN

El oocito humano por sus condiciones estructurales y fisiológicas normalmente se ve afectado por las bajas temperaturas. Dentro de los principales inconvenientes o afecciones que sufren los óvulos durante la criopreservación encontramos:

1. Daño de la zona pelúcida. Estudios preliminares en ratones permitieron comprobar que la criopreservación inducía cambios en la zona pelúcida y/o liberación prematura del contenido de los gránulos corticales,^{1,2} con inhibición de la fertilización; dentro de los daños más importantes observados en la zona pelúcida por enfriamiento están las fracturas, disrupción de la membrana plasmática y desorganización extensiva del ooplasma, así como endurecimiento de la zona pelúcida, que es superado con el uso del ICSI.
2. Daño del citoesqueleto. Donde el eje meiótico ha demostrado ser altamente sensible a cambios de temperatura, en especial al enfriamiento; las anomalías producidas pueden ser: reducción del tamaño del eje, desorganización y/o desaparición, algunas veces asociado con dispersión de los cromosomas. Sin embargo, dado que el dimetil sulfóxido (DMSO) favorece la polimerización de la tubulina mientras que las bajas temperaturas causan despolimerización

de la misma, la combinación de DMSO y bajas temperaturas tiene un efecto protector.³⁻⁶

La criopreservación del óvulo humano es una herramienta útil en técnicas de reproducción asistida, tanto para las pacientes, como para las clínicas de infertilidad. El óvulo humano a pesar de ser una célula tan importante en la historia natural, ha sido muy esquiva a las técnicas de criopreservación.

Con la criopreservación de óvulos por curva lenta, utilizada desde 1986 cuando se consiguió la primera gestación a partir de óvulos congelados,⁷ en sus diferentes variaciones se emplean bajas tasas de enfriamiento ($< 1^\circ\text{C}/\text{min}$) y concentraciones de crioprotectores de aproximadamente 1,5 mol/Lit, donde la principal limitante es la toxicidad de los crioprotectores, daños por enfriamiento y formación de cristales de hielo intracelulares con tasas de embarazo, supervivencia y clivaje de 28%, 5%, 76% y 60% respectivamente.^{2,7} La técnica no fue adoptada en forma amplia por la pobre reproducibilidad de sus resultados,² motivo por el cual las clínicas de reproducción asistida no habían asumido la criopreservación de óvulos como una herramienta rutinaria en el manejo de pacientes con disfunción reproductiva.⁸

Mas adelante en 1997 se reporta el primer nacimiento de un embrión logrado a partir de óvulo descongelado e ICSI con una tasa de supervivencia del 33,3%, tasa de fertilización del 50%, tasa de clivaje del 50%, donde realizaron, transferencia de un único embrión, logrando un embarazo.⁸ En otro estudio con 10 óvulos donados criopreservados, obtuvieron una tasa de supervivencia del 30%, tasa de fertilización del 66,6%, y una gestación.⁹

La vitrificación es un método de criopreservación en el cual hay solidificación de una solución cuando se enfría a velocidades altas formando un estado vídrioso, no por cristalización sino por elevación extrema de la velocidad;¹⁰ es un procedimiento simple que requiere menos tiempo de procesamiento y ha demostrado ser más seguro y efectivo que la criopreservación por curva lenta.¹¹

Kuwayama,¹² en el 2001, realizó modificaciones exitosas a la técnica de vitrificación, donde además de las altas tasas de enfriamiento y calentamiento se disminuyen las concentraciones de crioprotectores en un *Minimum Volume Cooling* (MVC).^{5,6,12}

Esta técnica busca minimizar o eludir los inconvenientes de la congelación por curva lenta como la formación de cristales de hielo intra y extracelulares, lesiones por enfriamiento, toxicidad de los crioprotectores, choque osmótico, lo cual ha sido demostrado con altas tasas de supervivencia y finalmente altas tasas de embarazo.^{5,12}

La técnica de vitrificación por *cryotop* hasta el momento garantiza la estabilidad del eje meiótico y los cromosomas, de forma que evita anomalías genéticas asociadas a la técnica de criopreservación.¹²

La criopreservación es una herramienta que facilita el almacenamiento a largo plazo de oocitos de pacientes en peligro o riesgo de perder su función ovárica y permite una gran flexibilidad en los servicios de fertilidad, aliviando las preocupaciones éticas asociadas con la preservación de embriones.¹

Aunque el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es una complicación iatrogénica rara derivada de la hiperestimulación ovárica controlada (HOC), puede tener grandes repercusiones multisistémicas y algunas de ellas fatales.¹³ Dentro de las estrategias para la prevención de estas complicaciones desde 1990 se cuenta con la congelación de embriones,¹⁴ como lo aplicó el grupo de Wada en 1993,^{15,16} criopreservando selectivamente todos los embriones de las mujeres que presentaban niveles mayores de 3.500 pg/ml en el día de aplicación de gonadotropina coriónica humana (hCG).

La realidad es que en la actualidad la criopreservación de oocitos es utilizada en un número limitado de clínicas particulares en Italia, Alemania, EEUU, Sur América y Asia.^{6, 8, 17, 18}

MATERIALES Y MÉTODOS

Una paciente de 21 años, con infertilidad secundaria por dos embarazos espontáneos ectópicos previos,

por lo cual se le efectuó salpingectomía bilateral, se sometió a un esquema de HOC. Alcanzó niveles séricos de estradiol de 5.000 pg/ml, motivo por el cual se acudió a la criopreservación de óvulos, con el propósito de evitar la severidad de la sintomatología. Dos meses después del restablecimiento de su condición clínica se procede a la desvitrificación y fertilización de estos óvulos para transferencia intrauterina y se consigue un embarazo normal.

Hiperestimulación ovárica controlada

Se consiguió con el uso del agonista GnRH a partir del primer día de la menstruación, con dosis de 0,5 mg/día vía subcutánea; a partir del tercer día del ciclo se inició estímulo con r-FSH a dosis de 150-250 UI/día hasta obtener folículos de 18-22 mm de diámetro mayor, momento en el cual se aplicaron 10.000 UI de hCG y 34-36 horas después bajo visión ecográfica se practicó la recuperación de los óvulos vía transvaginal, utilizando ecógrafo Hitachi (EUB-405) con transductor transvaginal de 6,5 MHz.

Selección y vitrificación

de óvulos en el laboratorio

Los oocitos una vez recuperados fueron desnudados con hialuronidasa 80 UI/ml (Lab Sage In vitro Fertilization Inc, Troumbull USA), se evaluó su madurez y se vitrificaron mediante la técnica *cryotop*, diseñada y descrita por Kuwayama y col.;^{1, 10} la vitrificación se realizó con el método MVC, con soluciones crioprotectoras (Kitazato Co, Tokyo, Japan), los óvulos se equilibraron en solución ES: EG + DMSO (*Equilibration solution* - Kitazato Co, Tokyo, Japan), durante diez minutos y luego se colocaron en solución de vitrificación VS (Kitazato Co, Tokyo, Japan) consistente de EG + DMSO + sacarosa; los óvulos se cargaron en forma rápida en MVC aprox 2 μ l de VS y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido (NL), manejando tasas rápidas de enfriamiento (-23.000°C/min).

Preparación endometrial

Dos meses después de la aspiración transvaginal, la paciente se sometió a un esquema de preparación

endometrial con valerianato de estradiol en dosis crecientes, inicialmente 2 mg y en el día 14 del ciclo dosis de 6 mg/día, manteniéndose así hasta el momento de la prueba de embarazo. A partir del día 13 (tres días antes de la transferencia de embriones), se inició la aplicación de 50 mg de progesterona natural inyectable.

Desvitrificación de óvulos y transferencia de embriones

Los óvulos se desvitrificaron por medio de tasas rápidas de calentamiento (12.000°C/min), colocándolos un minuto en solución TS (*Thawing solution*) de desvitrificación, sacarosa 1M a 37°C; luego se equilibraron lentamente en solución DS (Diluent solution Kitazato Co, Tokyo, Japan) durante tres minutos a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados consecutivos en medio WS (Washing solution, Kitazato Co, Tokyo, Japan). Inmediatamente se colocaron en medio de fertilización en incubación durante dos a cuatro horas cuando se evaluó su viabilidad y a los viables se les realizó ICSI. Veinticuatro horas más tarde se evaluó la presencia de pronúcleos y se continuó el cultivo *in vitro* por 72 horas hasta el día de la transferencia intrauterina. A la paciente se le aplicó gel vaginal de progesterona cuatro horas antes del procedimiento que se llevó a cabo bajo guía ecográfica transabdominal con catéter *soft frydman set echo*[®] (Laboratoire CCD, París, Francia).

RESULTADOS

Después de la HOC se recuperaron once óvulos, nueve de ellos en metafase II; se vitrificaron siete,

de los cuales al momento de la desvitrificación sobrevivieron cinco. A las 24 horas post ICSI cuatro de ellos presentaban pronúcleos y 72 horas después de cultivo se transfirieron tres embriones de seis blastómeras en el día 16 del ciclo de la paciente (**tabla 1**). Siete días después de la transferencia intrauterina se realizó seguimiento hormonal (**tabla 2**) hasta observar latido cardíaco. Cuando se realizó este escrito la paciente tenía una gestación normal de una niña de 20 semanas.

DISCUSIÓN

La criopreservación de óvulos humanos trae múltiples ventajas y beneficios tanto para las mujeres para salvaguardar su fertilidad y futura maternidad, como para las clínicas o centros de reproducción asistida, con lo cual pueden ofrecer nuevas y mejores alternativas a sus pacientes en tratamiento.

Tabla 1. Evolución de los óvulos postdesvitrificación

Evento	Número
Óvulos vitrificados	9
Óvulos desvitrificados	9
Óvulos recuperados	7
Óvulos viables	5
Óvulos fertilizados	4
Embriones transferidos	3
Gestación	+

Tabla 2. Seguimiento de niveles séricos de progesterona (P4), estradiol (E2), gonadotropina coriónica humana (hCG), post transferencia embrionaria (T.E)

Día post T.E.	7	12	16	23	30	38	45
P4 ng/dl	15	20	>40	>40	17	23	>40
Estradiol pg/ml	133	220	379	207	459	1.670	23.850
B hCG mUI/ml	—	176	945	12.147	53.600	113.201	185.200

La posibilidad de vitrificar óvulos de pacientes con SHO conserva las ventajas de la criopreservación de embriones hasta el momento utilizada; además evita los dilemas éticos, morales, legales y de credo que conlleva la criopreservación de los mismos, conservando las tasas de fertilización, desarrollo embrionario y embarazo.

Dentro de las múltiples ventajas que ofrece la vitrificación de óvulos tenemos el que permite un adecuado manejo de programas de donación de óvulos, así como que constituye una opción frente a inconvenientes en el momento de la obtención de la muestra seminal, como método para salvaguardar la fertilidad de pacientes oncológicas y una alternativa para controlar el reloj biológico de la maternidad, entre otras.

De esta forma se presenta el primer embarazo logrado a partir de óvulos vitrificados en Colombia y Latinoamérica.

REFERENCIAS

- Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven, Reineke A, Harjte M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987;2:695-700.
- Gook D, Osborn S, Johnson W. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2 propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum reprod* 1993;8:1101-9.
- Tucker M, Wright G, Morton P, Shangus L, Massey J, Kort H. Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1,2 propanediol and sucrose. *Hum Reprod* 1996;11:1513-5.
- Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril* 1998; 69:944-57.
- Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80:223-4.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999;14:3077-9.
- Chen C. Pregnancy after oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1:884-6.
- Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti P, Magrini O, Flamigni C. Birth of healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;68:724-6.
- Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M, Marazzi A, Gómez M. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil Steril* 1998;69:555-7.
- Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:583-60.
- Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favourable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002;78:449-53.
- Kuwayama M. Vitrification of human oocytes and embryos. In: Suzuki S (ed). *IVF update [In Japanese]*. Tokyo: Medical view co.; 2001. p. 230-34.
- Mozes M, Bogokowsky H, Antebi E, Lunenfeld B, Rabau E, Serr DM, Dacid A, Salomy M. Thromboembolic phenomena after ovarian stimulation with human gonadotrophins. *Lancet* 1965;2:1213-5.
- Amso NN, Ahuja KK, Morris N, Shaw RW. The management of predict ovarian hyperstimulation involving gonadotrophin-releasing hormone analog with elective cryopreservation of all pre-embryos. *Fertil Steril* 1990;53:1087-90.
- Wada I, Matson Pl, Troup SA, Morrol DR, Hunt L, Liebermant BA. Does elective cryopreservation of all embryos from women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome reduce the incidence of the condition. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:265-9.
- Aboulgar MH, Mansour RT. Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. *Hum Reprod Update* 2003;9:275-89.
- Azambuja R, Stachecki J, Badalotti M, Michelon Petracco A. Nascimento de feto a termo após congelamento de oocitos. *J Brasileiro Reprod Assist* 2002;6: 119-21.
- Van der Elst J. Oocyte freezing: here to stay? *Hum Rep Update* 2003;9:463-70.