



Facultad de Ciencias de la Salud

Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud Pública e  
Inmunología y Microbiología Médica.

**UTILIDAD DE LA VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES  
EN LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME  
DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA**

**Tesis Doctoral**

Director de Tesis

**Juan Antonio García Velasco**

Doctoranda

**Leyre Herrero Grassa**

Madrid, España. 2014



D. Juan Antonio García Velasco, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud pública e Inmunología y Microbiología Médica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, y Co-director del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) en Madrid

#### CERTIFICO

Que Dña. Leyre Herrero Grassa, licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: **“UTILIDAD DE LA VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES EN LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA”**.

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud Pública e Inmunología y Microbiología Médica de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora en Ciencias de la Salud.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 1 Noviembre de 2014.

Fdo. Juan Antonio García Velasco



A mi marido y mis niños  
A mis padres y hermanos  
A mis amigos y compañeros del IVI



## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor García-Velasco, por ser siempre inspirador, por abrirme las puertas desde el principio, por darme alas, por confiar en mí, incluso después de tantos años y tantas cosas pasadas. Gracias a ti, siempre a ti.

A Antonio Requena por tener siempre una palabra amiga. A Yolanda, Fernando y David Por haberme ayudado cuando lo he necesitado, por hacer del duro trabajo de “mandar” un arte que todos apreciamos. A María Cruz, porque siempre está ahí para lo que necesitemos. Gracias.

A mis compañeros del IVI, por enseñarme cosas nuevas todos los días. Sin todos vosotros este trabajo nunca hubiera sido posible, porque todos y cada uno habéis puesto un granito de arena. Sois unos “máquinas”.

A mis amigos del IVI, porque mis días de trabajo sin vosotros serían un poco más tristes, por vuestro apoyo y comprensión siempre. Gracias por estar a mi lado.

A mis mejores amigas, Jéssica, Silvia y Ana, por estar ahí desde siempre, por hacer mi vida mejor y más divertida. A Natalia por ser como una hermana, por contar siempre conmigo. A todos mis amigos del pasado y el presente, que han hecho de mí lo que soy ahora.

A mi madre, que me cuida como si aún fuese su niña pequeña, que me enseña a ser mejor cada día, y a mi padre, que me enseña a luchar por mis sueños y por ser feliz.

A mis hermanos, grandes y pequeños, porque la vida compartida siempre es mejor, y cada uno de vosotros me aportáis cosas muy importantes para mí. A toda mi familia, mi abuelo, mis tíos y primos. Me hacéis crecer feliz.

A mis niños, Alejandra, Mateo y Gonzalo, por entender que, además de los juegos, hay otras cosas importantes en la vida. Os quiero pequeñitos, espero que nunca dejéis de querer jugar conmigo.

A Muñoz, que siempre ha creído en mi, que me ha enseñado a “currar” como la que más, y que me apoya en todo, incondicionalmente. Por darme lo más importante en mi vida, por ser mi familia cada segundo de cada día. Te quiero siempre Peq, siempre.



# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
<b>Capítulo 1 INTRODUCCION</b>	<b>9</b>
A. Historia de la reproducción asistida	11
B. Esterilidad	15
C. Técnicas de reproducción asistida en el laboratorio	16
D. Estimulación ovárica controlada e inducción de la ovulación	18
E. Ovocitos	22
• Ovogénesis	22
• Foliculogénesis	24
• Competencia ovocitaria	26
• Calidad y dismorfismos ovocitarios	28
F. Embriones en el laboratorio de FIV	31
<b>Capítulo 2 LA CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES</b>	<b>33</b>
A. Desarrollo histórico de las técnicas de criopreservación	33
B. Estrategias de criopreservación	37
• La congelación lenta	37
• La vitrificación	38
C. Estado actual de las técnicas de criopreservación	41

<b>Capítulo 3 CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS:</b>	
<b>CONGELACIÓN LENTA VS VITRIFICACIÓN</b>	<b>49</b>
A. Indicaciones de la criopreservación de ovocitos	57
B. Dificultades asociadas la criopreservación de ovocitos	59
C. Efectos de la criopreservación sobre los ovocitos	61
D. Ventajas de la vitrificación	65
E. Efecto de la criopreservación en la morfología, en la conformación del huso meiótico y en el ADN del ovocito	69
<b>Capítulo 4 VITRIFICACIÓN EN LA PREVENCIÓN DEL SHO</b>	<b>79</b>
A. El síndrome de hiperestimulación ovárica	79
B. Inducción de la ovulación con agonistas de la GnRH y vitrificación de ovocitos como alternativa al <i>coasting</i> en pacientes con riesgo de SHO	87
<b>Capítulo 5 VITRIFICACIÓN Y TRANSFERENCIA EMBRIONARIA DIFERIDA</b>	<b>97</b>
Comparación de los resultados obtenidos tras la vitrificación de ovocitos y embriones en ciclos de FIV con transferencia diferida por riesgo de SHO	99
<b>Capítulo 6 CONCLUSIONES</b>	<b>111</b>
<b>Capítulo 7 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>115</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Anthony Van Leeuwenhoek.	12
<b>Figura 2:</b> Página principal del periódico (1978, UK) en el que aparece la fotografía de Louise Brown.	14
<b>Figura 3:</b> Fotografías de Dolly, la oveja que fue obtenida a partir de transferencia nuclear.	14
<b>Figura 4:</b> Acción de las hormonas ováricas en el eje hipotálamo hipófisis Ovario en ciclo menstrual normal.	18
<b>Figura 5:</b> Resumen de los mecanismos de acción de las 3 gonadotropinas utilizadas en EOC.	21
<b>Figura 6:</b> Resumen de la ovogénesis.	23
<b>Figura 7:</b> Foliculogénesis, variación del grosor endometrial y del nivel de las hormonas sexuales a lo largo del ciclo menstrual.	24
<b>Figura 8:</b> Características de un ovocito competente.	27
<b>Figura 9:</b> Diferentes morfologías del corpúsculo polar.	29
<b>Figura 10:</b> Diferentes morfologías de la ZP.	30
<b>Figura 11:</b> Anomalías morfológicas del ovocito.	30
<b>Figura 12:</b> Desarrollo embrionario ideal.	32

<b>Figura 13:</b> Fotografías de ovocitos MII tomadas en un microscopios con luz polarizada.	62
<b>Figura 14:</b> Fotografías de las consecuencias negativas de la criopreservación sobre los ovocitos.	64
<b>Figura 15:</b> Composición química de los principales CPA utilizados en la vitrificación.	66
<b>Figura 16:</b> Diferentes tipos de soportes para la vitrificación.	67
<b>Figura 17:</b> Variación del aspecto de un ovocito durante la vitrificación.	68
<b>Figura 18:</b> Desvitrificación del mismo ovocito en las diferentes soluciones.	68
<b>Figura 19:</b> Resumen de los datos mas relevantes de la de la tabla 1 del artículo (Capítulo 3).	72
<b>Figura 20:</b> Resumen de los resultados más relevantes obtenidos tras la transferencia de los embriones en los grupos de estudio (Capítulo 4).	89
<b>Figura 21:</b> Resumen de las características y los resultados obtenidos tras la desvitrificación en ambos grupos de estudio (Capítulo 5).	102
<b>Figura 22:</b> Resumen de los datos acumulados en los grupos de estudio (Capítulo 5).	102

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>CC</b>	Citrato de Clomifeno
<b>CP</b>	Corpúsculo Polar
<b>CPA</b>	Agentes crioprotectores, ( <i>Cryoprotectant Agents</i> )
<b>DGP</b>	Diagnóstico Genético Preimplantacional
<b>DMSO</b>	Di-Metil-Sulfóxido
<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol
<b>EG</b>	Etilen Glicol
<b>EOC</b>	Estimulación Ovárica Controlada
<b>EP</b>	Espacio Perivitelino
<b>FIV</b>	Fecundación <i>in Vitro</i>
<b>FSH</b>	Hormona folículo-estimulante ( <i>Follicle Stimulating Hormone</i> )
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de las gonadotropinas ( <i>Gonadotropin release hormone</i> )
<b>hMG</b>	Gonadotropina Menopáusica humana ( <i>Human Menopausal Gonadotropin</i> )
<b>ICSI</b>	Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides ( <i>IntraCyttoplasmic Sperm Injection</i> )
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante ( <i>Luteinizing Hormone</i> )
<b>MCI</b>	Masa Celular Interna
<b>MII</b>	Metafase II
<b>NL</b>	Nitrógeno Líquido
<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona
<b>PCO</b>	Ovario Poliquístico ( <i>PoliCystic Ovary</i> )

<b>PI</b>	Post Inseminación
<b>PN</b>	Pronúcleo
<b>RA</b>	Reproducción Asistida
<b>REL</b>	Retículo Endoplásmico Liso
<b>SHO</b>	Síndrome de hiperestimulación ovárica
<b>SOP</b>	Síndrome de Ovario Poliquístico
<b>TE</b>	Trofoectodermo
<b>TRA</b>	Técnicas de Reproducción Asistida
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>VG</b>	Vesícula Germinal
<b>ZP</b>	Zona Pelúcida
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling</i>
<b>SPSS</b>	Programa estadístico <i>Statistical Package for Social Science</i>
<b>MS</b>	Huso meiótico ( <i>Meiotic Spindle</i> )

## **RESUMEN**

Leyre Herrero Grassa

### **UTILIDAD DE LA VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES EN LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA**

Facultad de Ciencias de la salud

Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud Pública e Inmunología y Microbiología Médica.

Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España. 2014.

La criopreservación es una parte fundamental de los tratamientos de reproducción asistida, que maximizan opciones clínicas de los especialistas, y las probabilidades de embarazo de los pacientes. Los resultados obtenidos tras la aplicación de estas técnicas deben ser comparables a los obtenidos en fresco para poder afirmar que un programa de criopreservación es eficaz.

La vitrificación es un novedoso método de criopreservación que ha demostrado ser seguro, fácilmente reproducible y eficaz en numerosas publicaciones, lo que hace que sea el método de rutina en muchos laboratorios cada. Se basa en una velocidad de enfriamiento ultrarrápida, una concentración de crioprotectores muy alta, y un volumen de medio muy pequeño.

La vitrificación, además de ser eficaz en embriones, ha permitido la criopreservación segura de blastocistos, que con los métodos tradicionales no

alcanzaban tasas de supervivencias aceptables; y lo que es más novedoso, ha permitido la criopreservación de ovocitos, células con características muy particulares que hacen difícil su criopreservación. Las tasas de supervivencia, gestación y recién nacidos con vitrificación de ovocitos son inmejorables, y las posibilidades clínicas que se abren a los pacientes con esta nueva indicación son muchas, como la preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas o por motivos sociales, o la formación de bancos de óvulos para la donación.

Otra nueva indicación, nacida de la posibilidad de criopreservar ovocitos, es la cancelación de la transferencia embrionaria en el ciclo de estimulación debido a riesgo de que la paciente desarrolle Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO). Estas pacientes, que en nuestro centro solían llevar a cabo protocolos de prevención como el *coasting*, se ven beneficiadas por la vitrificación sus ovocitos, o también por la vitrificación de embriones resultantes del ciclo de FIV, que serán transferidos posteriormente al ciclo de hiperrespuesta, anulando el riesgo de sufrir un SHO moderado o grave.

En este trabajo se repasa el estado actual de las técnicas de criopreservación y además tres estudios consecutivos que se han realizado en torno a estos temas. El primero compara dos protocolos: la vitrificación y la congelación lenta de ovocitos, y analiza el daño celular inducido por cada uno de ellos. El segundo de los estudios compara la tradicional estrategia de actuación frente al SHO, el *coasting*, con la vitrificación de los ovocitos de estas pacientes. Y el tercero compara, también en estas pacientes en riesgo de sufrir SHO, los resultados obtenidos tras la vitrificación de ovocitos y embriones.

Los resultados obtenidos de estos estudios concluyen que la vitrificación es una técnica segura y de fácil aplicación, que ayuda en diferentes situaciones clínicas y que no induce daño celular ni altera el ADN del ovocito. En el caso de las pacientes con riesgo de SHO la vitrificación de embriones da lugar al almacenamiento de un número de embriones alto, así que será necesario valorar cada caso para aconsejar a los pacientes el protocolo que más convenga a su historia clínica.



## **Capítulo 1**

### **INTRODUCCIÓN**



## A. HISTORIA DE LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA

**La fertilidad**, la mujer y la reproducción han sido siempre temas de gran importancia en todas las sociedades y civilizaciones de la historia de nuestro mundo. En cambio, la esterilidad se ha considerado un gran problema social y médico, y se ha vivido como una amenaza y un tema tabú.

**La esterilidad** es hoy un serio problema, pero sabemos que esta preocupación existe desde los tiempos de los egipcios, cuando ya se escribía sobre ginecología y fertilidad en tratados médicos como en el “papiro Ebers”. También hay documentos escritos de hebreos y judíos para los cuales la fertilidad era un regalo divino. Más tarde la civilización griega, en la que se basó durante mucho tiempo la medicina occidental, desarrolló un increíble método de diagnóstico temprano del embarazo utilizando una mezcla de granos de trigo y cebada, arena y dátiles. Al mojar esta mezcla con orina de una mujer, se sabía que estaba embarazada si hacía germinar las semillas, gracias a la acción de la hCG (Morice et al. 1995)

La escuela de Hipócrates, en el año 460 AC, intentó construir un sistema médico basado en el racionalismo, con examen clínico, diagnóstico y tratamiento apropiados. Se escribieron entonces numerosos tratados en los que se describían patologías ginecológicas, como en “The Excision of the Fetus” (Hipócrates, Tratados hipocráticos IV). Seguidores de esta escuela como Sorano de Efeso o Galeno fundaron las bases de la medicina teórica y práctica de las sociedades Romana y Bizantina durante 1400 años.

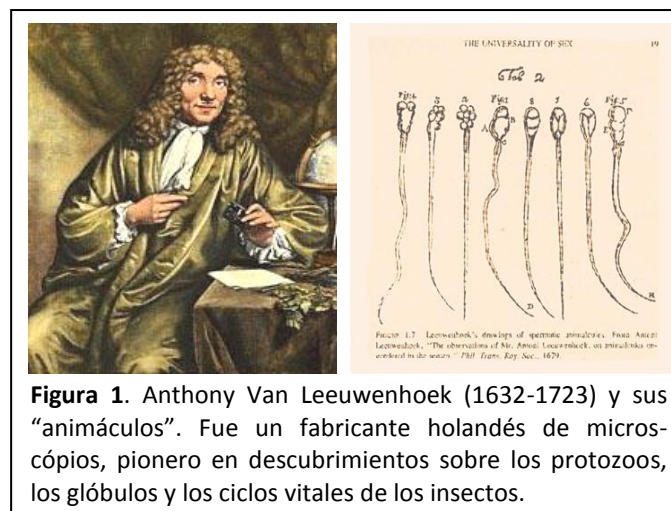
La escuela árabe (700-1200 DC) contó con un prestigioso médico llamado Avicena (980-1037), que escribió unos 30 tratados médicos y estudió la infertilidad y sus posibles causas femeninas y masculinas.

También en la época medieval hubo médicos que estudiaron la infertilidad, como Arnau de Villeneuve (1240-1311). La medicina medieval se basaba en la griega, lo que provocó un estancamiento del conocimiento, hasta que en el Renacimiento se

produjo un progreso real de la medicina y la ciencia, gracias a la observación y la disección, llevadas a cabo por anatomistas como Vesalio (1514-1564) o Leonardo da Vinci (1452-1519).

A partir de 1600 surgieron importantes descubrimientos. En 1651 William Harvey (1578-1657), anatomista inglés, presentó una nueva teoría sobre el desarrollo embrionario humano conocida como “Preformacionismo”, que postulaba el crecimiento y la diferenciación de las estructuras especializadas a partir del ovocito (“ex ovo omnia”). En 1672 Reigner de Graaf (1641-1673) escribió “De Mullerium Organis” que describía el ovario y el ciclo folicular.

En el siglo XVIII comienza la verdadera **metodología científica** y el razonamiento médico se transforma. Anthony Van Leeuwenhoek (1632-1723) construyó un primer microscopio y observó por primera vez los espermatozoides, a los que llamó “animáculos” (ver **figura 1**) y que pensaba contenían un embrión prácticamente formado.



**Figura 1.** Anthony Van Leeuwenhoek (1632-1723) y sus “animáculos”. Fue un fabricante holandés de microscopios, pionero en descubrimientos sobre los protozoos, los glóbulos y los ciclos vitales de los insectos.

La primera inseminación artificial llevada a cabo con éxito en mamíferos fue realizada en 1784 por un sacerdote italiano, Lázaro Spallanzani (1729-1799), en perros (Spallanzani 1784). En 1785 Jonh Hunter (1728-1793) realizó las primeras inseminaciones artificiales humanas, que resultaron con el nacimiento de un niño sano

al inyectar el semen de un varón con hipospadias en la vagina de su mujer (Hanson and Rock 1951)

Durante los siglos XIX y XX se han descubierto numerosas sustancias terapéuticas y se han dado pasos decisivos en el tratamiento de la infertilidad, como la introducción de la valoración bajo microscopio de la calidad seminal. En 1884 se produjo la primera inseminación artificial con semen de donante en el Jefferson Medical College, al inseminar con éxito a una mujer con el semen de un estudiante (Hard 1909). Walter Heape (1855-1929) introdujo la idea del cultivo de embriones en el laboratorio, y consiguió un embrión preimplantatorio del oviducto de una coneja que posteriormente transfirió a otra, donde continuó su desarrollo (Heape 1891).

A principios del siglo XX comenzó el desarrollo de la **endocrinología reproductiva** y se comenzaron a utilizar gonadotropinas para estimular e inducir la ovulación (Ascheim and Zondek 1928). En 1944 se crea la Asociación Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) y el equipo de Harvard de John Rock (1890-1984) comunica la realización de los primeros experimentos de fecundación *in vitro* (FIV) en ovocitos humanos (Rock and Hertig 1944). En 1951 se consigue la primera transferencia exitosa de embriones bovinos (Willet et al. 1951) y se descubre la capacitación del semen (Chang 1951). En 1953 se consiguen embarazos con semen congelado usando glicerol como agente crioprotector (Bunge and Sherman 1953). En 1966 se obtienen los primeros ovocitos humanos mediante laparoscopia (Edwards et al. 1966). Continúan mejorando las técnicas de manipulación y estimulación ovárica controlada hasta que en 1978 (ver **figura 2**) nace la primera niña sana en el mundo tras una FIV y transferencia embrionaria (Steptoe and Edwards 1978). En 1983 se consiguieron los primeros embarazos con ovocitos donados (Buster et al. 1983, Lutjen et al. 1984). En 1987 se publica un nuevo método de recuperación de ovocitos mediante ecografía transvaginal (Russell et al. 1987). En 1986 se produce la primera congelación-descongelación, fecundación y transferencia de ovocitos humanos (Chen 1986). En 1988 se comunica el primer embarazo obtenido inyectando espermatozoides en el espacio perivitelino del ovocito (SUZI) (Ng et al. 1988). Algún error en esta técnica llevó al desarrollo de la microinyección de un solo espermatozoide viable en cada

ovocito (ICSI) lo que posibilitaría en embarazo en casos de patologías seminales graves (Palermo et al. 1992). El ICSI sigue siendo hoy la técnica de elección en casos de factor masculino.

A partir de 1990 se unieron las **técnicas de reproducción asistida y biología molecular** dando lugar al desarrollo del Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP). El grupo de Handyside consiguió el primer embarazo tras la determinación del sexo de embriones con riesgo de padecer una enfermedad ligada al sexo (Handyside et al. 1990) y más tarde comunicó el nacimiento de un niño sano tras DGP para la detección de fibrosis quística (Handyside et al. 1992).

Hoy en día la FIV cuenta con un gran número de aplicaciones en ciencias básicas y aplicadas, como la transferencia nuclear (ver **figura 3**) o clonación en animales (Campbell et al. 1996) o para conseguir células madre embrionarias de la masa celular interna de blastocistos cultivados *in vitro* (Hwang et al. 2004, Lanzendorf et al. 2001).



## B. ESTERILIDAD

La esterilidad se define como la incapacidad de concebir o lograr un embarazo tras un año de relaciones sexuales no protegidas. Se considera esterilidad primaria si la pareja no ha conseguido un embarazo nunca, y secundaria si se consigue un embarazo pero no otro después de un año de relaciones sin protección.

Según la OMS entre un 2% y un 10% de las parejas tienen este problema, pero dar porcentajes exactos es muy complicado, debido al sesgo en la recogida de datos y las diferencias demográficas que existen entre los diferentes países del mundo.

Las **causas** pueden ser tanto femeninas (tubáricas, anatómicas, ováricas o sistémicas) como masculinas, mixtas e incluso múltiples. Aunque está demostrado que el factor que más afecta a la capacidad de conseguir embarazo es la edad de la mujer, ya que la fertilidad femenina disminuye con el aumento de la edad. A partir de los 35 años la capacidad reproductora de la mujer baja significativamente, y más aun a partir de los 40. Otro importante factor a tener en cuenta es el deterioro de las características del semen.

Cuando una pareja acude a una **consulta de esterilidad** deben investigarse simultáneamente a los dos miembros de la pareja, siendo imprescindibles la confirmación de la ovulación, la permeabilidad tubárica y la presencia de espermatozoides con morfología y movilidad normales, dentro de los parámetros definidos por la OMS en su última revisión en el 2010. En esta primera consulta además se realiza una anamnesis, una exploración ginecológica y ecográfica, y una analítica general con perfil hormonal de la mujer. En función de los resultados de estas primeras pruebas, los ginecólogos realizarán otras pruebas y encaminarán a los pacientes hacia la TRA que más les convenga.

## C. TECNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN EL LABORATORIO

Las TRA que se aplican a las parejas con problemas de infertilidad exigen coordinación entre las diferentes partes que forman una clínica de RA. Desde el laboratorio de análisis clínicos, donde se procesan muestras de sangre u orina, hasta el laboratorio de análisis genético, donde se estudia la dotación cromosómica de los embriones preimplantatorios.

A continuación se resumen las TRA que se llevan a cabo en un laboratorio de FIV:

- **Criopreservación de muestras de semen**, que se almacenan criopreservadas por tiempo indefinido, manteniendo, al menos en parte, sus propiedades funcionales.
- **Inseminación artificial**, que consiste en depositar en el tracto genital femenino los espermatozoides procesados de una muestra de semen preparada en el laboratorio.
- **FIV convencional**, o unión de ovulo y espermatozoide fuera del cuerpo de la madre con el fin de obtener un embrión de buena calidad que pueda dar lugar a un embarazo viable. En este caso el ovulo se pone en contacto con espermatozoides en medio de cultivo, sucediendo la fecundación en dicho medio.
- **ICSI**, que es otra forma de realizar una FIV, pero en este caso se utiliza un micromanipulador acoplado a un microscopio para introducir un único espermatozoide dentro de un óvulo maduro.
- **Cultivo de embriones**, que se realiza en medios de cultivo preparados para cada fase del desarrollo embrionario. Los embriones se pueden cultivar en el laboratorio durante un máximo de 6 días, hasta que abandonan la cubierta que los protege, la Zona Pelúcida (ZP), para implantar en el endometrio del útero materno.
- **Assited Hatching**, o eclosión asistida, que consiste en realizar un orificio en la ZP del embrión para facilitar su salida e implantación.

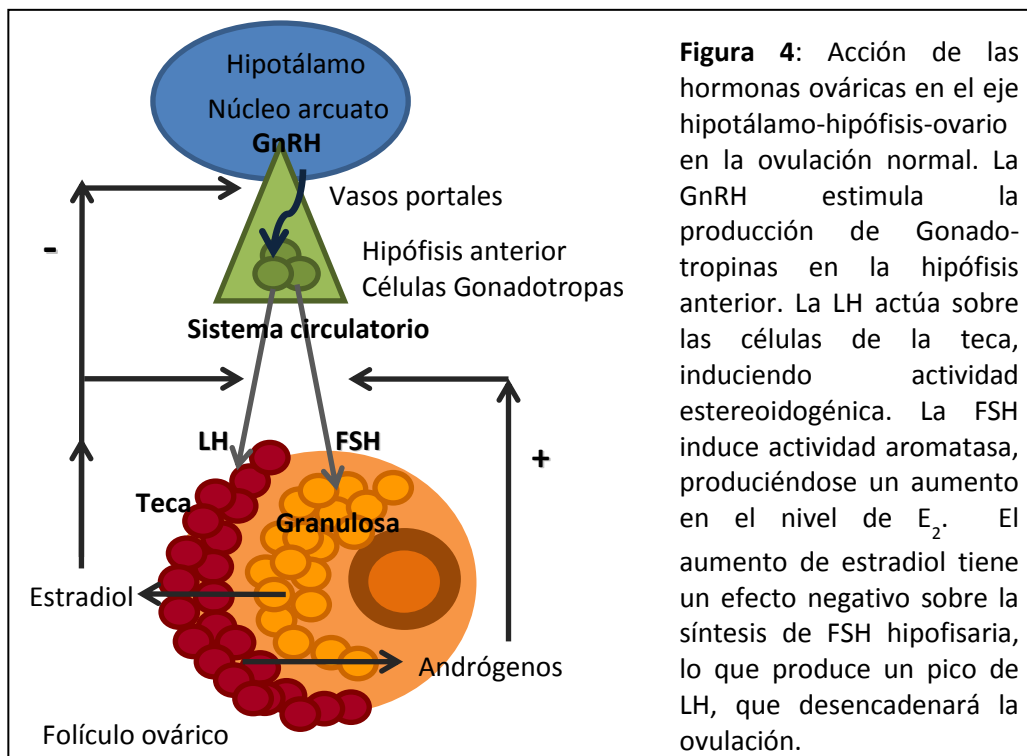


- **Criopreservación de embriones** en diferentes fases de desarrollo, tanto por ser excedentarios del tratamiento como por otras razones tanto personales como relacionadas con el propio tratamiento de reproducción asistida.
- **Criopreservación de ovocitos**, técnica de reciente introducción en los laboratorios de FIV que abre un mundo de posibilidades para los clínicos y las pacientes.
- **Donación de gametos**, tanto óvulos como espermatozoides, que se lleva a cabo cuando no es posible obtener los gametos de una de las partes de la pareja, o de ambas. En los laboratorios también se realiza la selección de los donantes y la gestión de los bancos de óvulos y semen.
- **Biopsia embrionaria y DGP**, para estudiar anomalías cromosómicas en los embriones antes de la implantación. El estudio genético de las células biopsiadas se realiza mediante PCR, FISH o *Arrays* de CGH (*Comparative Genomis Hybridization*).

La aplicación de una u otra técnica depende en cada caso de la historia de los pacientes, del resultado de sus pruebas diagnósticas y de la valoración por parte de los clínicos en la consulta de esterilidad.

## D. ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA E INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN

Para que tenga lugar una ovulación normal es necesario el correcto funcionamiento y coordinación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La Estimulación ovárica controlada (EOC) se puede utilizar en pacientes ovuladoras o anovuladoras, y pretende conseguir el número de folículos dominantes idóneos para el TRA que se va a utilizar en cada caso. Además se persigue un correcto desarrollo y maduración folicular, para poder así optimizar cada ciclo de estimulación.



**Figura 4:** Acción de las hormonas ováricas en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la ovulación normal. La GnRH estimula la producción de Gonadotropinas en la hipófisis anterior. La LH actúa sobre las células de la teca, induciendo actividad esteroideogénica. La FSH induce actividad aromatasas, produciéndose un aumento en el nivel de  $E_2$ . El aumento de estradiol tiene un efecto negativo sobre la síntesis de FSH hipofisaria, lo que produce un pico de LH, que desencadenará la ovulación.

Los folículos que crecen en un ciclo ovárico normal son dependientes de FSH en la fase folicular. La EOC pretende sobrepasar el umbral de FSH necesario para el desarrollo de un folículo, consiguiendo un desarrollo multifolicular como respuesta. Pero esta respuesta es diferente entre pacientes, pudiendo encontrarnos con:

- Pacientes normorespondedoras
- Hiperrespondedoras
- Y pacientes con baja respuesta a la EOC.

Actualmente se dispone de muchos fármacos que se utilizan tanto para estimulación ovárica como para la inducción de la maduración folicular y la ovulación. En los tratamientos de FIV se intenta conseguir un número óptimo de embriones de buena calidad que maximicen las posibilidades de embarazo, teniendo en cuenta las características de cada paciente. Para ello se pueden utilizar, entre otros:

- El **citrato de clomífero (CC)**: fue el primer fármaco que se utilizó para la inducción de la ovulación. Se absorbe por vía oral y se une a los receptores de estrógeno del hipotálamo, bloqueando la retroalimentación negativa del estradiol ( $E_2$ ) y activando la secreción de GnRH (Hormona liberadora de las Gonadotropinas), produciendo un aumento estable de FSH, LH y  $E_2$ . La supresión del CC da lugar, tras la disminución de gonadotropinas, a un pico estrogénico endógeno y una nueva oleada de gonadotropinas que, finalmente, desencadena la ovulación.
- **Inhibidores de la aromatasa**. La aromatasa es un sistema enzimático presente en el ovario y otros tejidos, que interviene en la conversión de testosterona y androstendiona en  $E_2$  y Estrona respectivamente. Los inhibidores de la aromatasa no esteroideos son activos por vía oral y no presentan acción antiestrogénica sobre el endometrio (no afecta a la posible implantación embrionaria). Su acción consistiría en bloquear la retroalimentación negativa de los estrógenos sobre el eje hipotálamo-hipofisario, aumentando los niveles de FSH y LH. Además aumentarían la expresión de receptores de FSH en el folículo debido al ambiente androgénico.
- **Gonadotropinas (LH, FSH y hMG)**, que se han utilizado durante más de 30 años para inducir la ovulación en mujeres infértiles. En la **figura 5** se exponen y explican la acción, indicaciones y ventajas de los fármacos basados en gonadotropinas disponibles hoy en día.
- **Análogos de la GnRH**: Son péptidos sintéticos con modificaciones en su estructura que alteran su afinidad por el receptor de la GnRH. Se comenzaron a utilizar como

adyuvantes en pacientes con fallos previos en TRA. Hoy en día con su uso se evita el pico prematuro de LH y se mejoran los resultados de los ciclos de FIV al aumentar el número de ovocitos aspirados. Se han desarrollado dos tipos de análogos:

1. **Los agonistas de la GnRH:** su afinidad por el receptor de la GnRH es mayor la propia GnRH, dando lugar a un efecto llamada (*flare up*) de liberación inicial de FSH y LH. Posteriormente producen una desensibilización. Se utilizan en EOC en tres protocolos: largo, corto o *flare up*, y *microflare up*, dependiendo de las características de la paciente.
2. **Los antagonistas de la GnRH:** Se unen y bloquean el receptor de la GnRH provocando en horas una supresión hipofisaria. Se administra en protocolo de dosis múltiple o de dosis única. Parece que estos fármacos reducen el número de ovocitos obtenidos, pero a su vez reducen el riesgo de SHO.

**La ovulación**, que se produce en cada ciclo menstrual normal, se desencadena debido a un aumento de LH hipofisaria. La LH estimula el folículo y la maduración del ovocito y su cúmulo, y desencadena la ruptura de la pared folicular, lo que acaba con la liberación de un ovocito maduro y potencialmente fecundable. En RA es importante controlar el momento de la ovulación para poder fijar el día de la inseminación, y la hora a la que debe realizarse la punción folicular en los casos de FIV. Hay diferentes formas de fijar el momento de la ovulación en los TRA:

- Identificando el pico endógeno de LH.
- Induciendo el pico de LH con la administración exógena de hCG. La hCG se utiliza por su similitud en estructura con la LH en ciclos naturales y estimulados con gonadotropinas exógenas, una vez que hay folículos maduros. La ovulación ocurre 37-38 horas tras la administración de hCG, por lo que los folículos deben ser aspirados 36 horas después.
- Inducción de la ovulación con LH recombinante.

- Inducción de la ovulación con agonistas de la GnRH, cuando en el ciclo se han usado antagonistas. Este protocolo se asocia con un menor riesgo de SHO.

**Figura 5:** Resumen de los mecanismos de acción de las 3 gonadotropinas utilizadas en EOC:

	<b>hMG</b>	<b>FSH</b>	<b>LH</b>
<b>Mecanismo de acción</b>	Tiene activad FSH y LH al 50%, recluta y estimula a los folículos, y a la vez facilita su maduración.	Reclutamiento folicular y estimulación de su crecimiento.	Estimula la maduración folicular.
<b>Indicaciones</b>	Se usa tanto en estimulación como en inducción de la ovulación.  Útil en pacientes con hipogonadismo hipogonadotropo.	Se usa tanto en estimulación como en inducción de la ovulación.  Útil en pacientes con LH elevada y PCO.	Útil en estimulación ovárica en pacientes jóvenes y LR.
<b>Ventajas</b>	Desarrollo folicular múltiple y acción LH juntas.	Desarrollo folicular múltiple. Pureza, efectividad y seguridad.	Reduce el desarrollo de folículos pequeños (<10 mm).
<b>Desventajas</b>	SHO y embarazo múltiple.	SHO y embarazo múltiple.	Coste elevado.

## E. OVOCITOS

Los ovocitos y los espermatozoides se forman ambos a través de la **meiosis**, que consiste en dos divisiones celulares sucesivas, tras un ciclo de replicación del ADN. La meiosis da lugar a células haploides, los gametos. Los ovocitos son los gametos femeninos y son las células más grandes del organismo. Poseen gran cantidad de material de reserva en su citoplasma, necesario para el posterior desarrollo del embrión. Un ovocito maduro con capacidad de ser fecundado posee la capacidad única de formar un nuevo individuo tras ser activado.

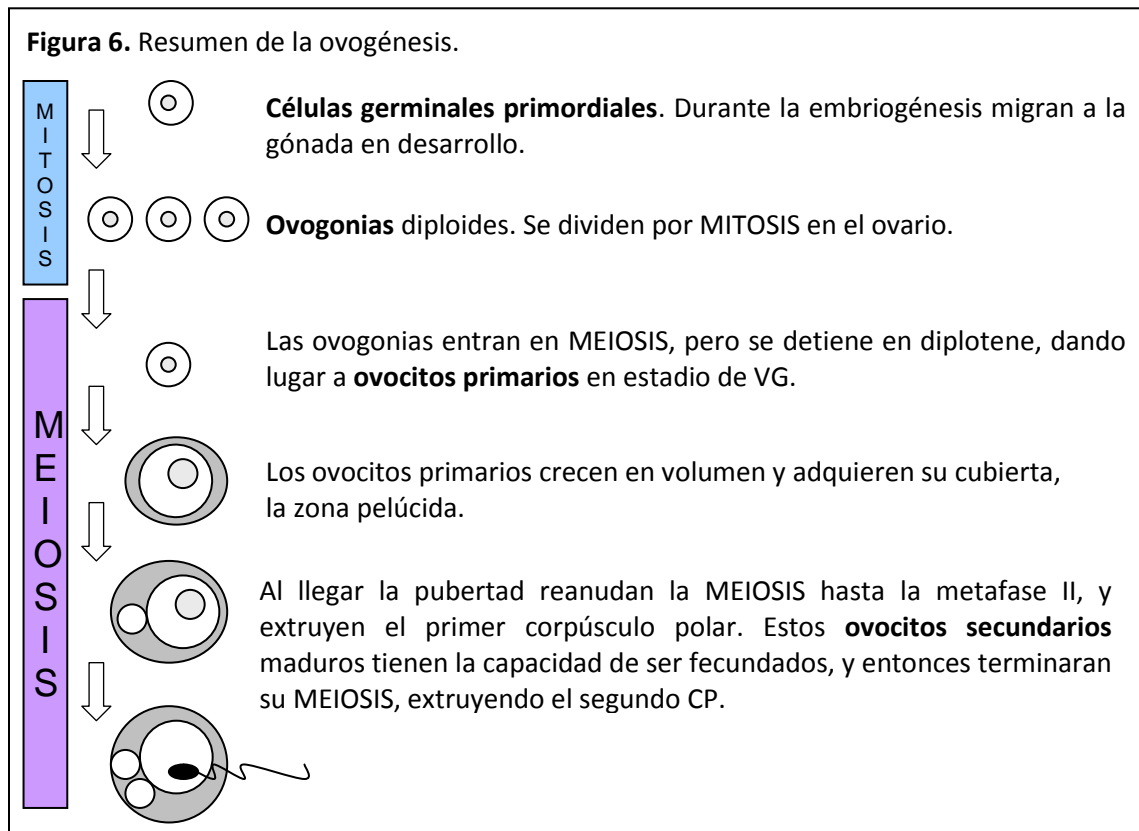
Un ovocito maduro tienen las siguientes **características observables** al microscopio:

- Está rodeado de células de la granulosa, que ayudan al ovocito en su crecimiento y maduración mediante conexiones citoplasmáticas.
- Posee una cubierta denominada zona pelúcida (ZP), que lo rodea y protege. Esta cubierta está formada principalmente por glicoproteínas secretadas por el propio ovocito y sus células acompañantes.
- El espacio perivitelino, donde se encuentra el primer corpúsculo polar (CP) resultante de la primera división meiótica.
- El citoplasma del ovocito está rodeado por la membrana plasmática, y cuenta con gran cantidad de material de reserva necesario para la división celular y el desarrollo embrionario temprano.

### La ovogénesis

Los ovocitos se desarrollan a partir de células germinales del embrión en un proceso denominado ovogénesis (Resumen en **figura 6**). Las células germinales se producen en el endodermo del saco vitelino del embrión y migran hacia la cresta genital en la quinta semana de gestación.

En este momento pasan a denominarse ovogonias. Durante la sexta y séptima semana de gestación entran en mitosis para aumentar su número y en la semana 8 es cuando comienza la meiosis.



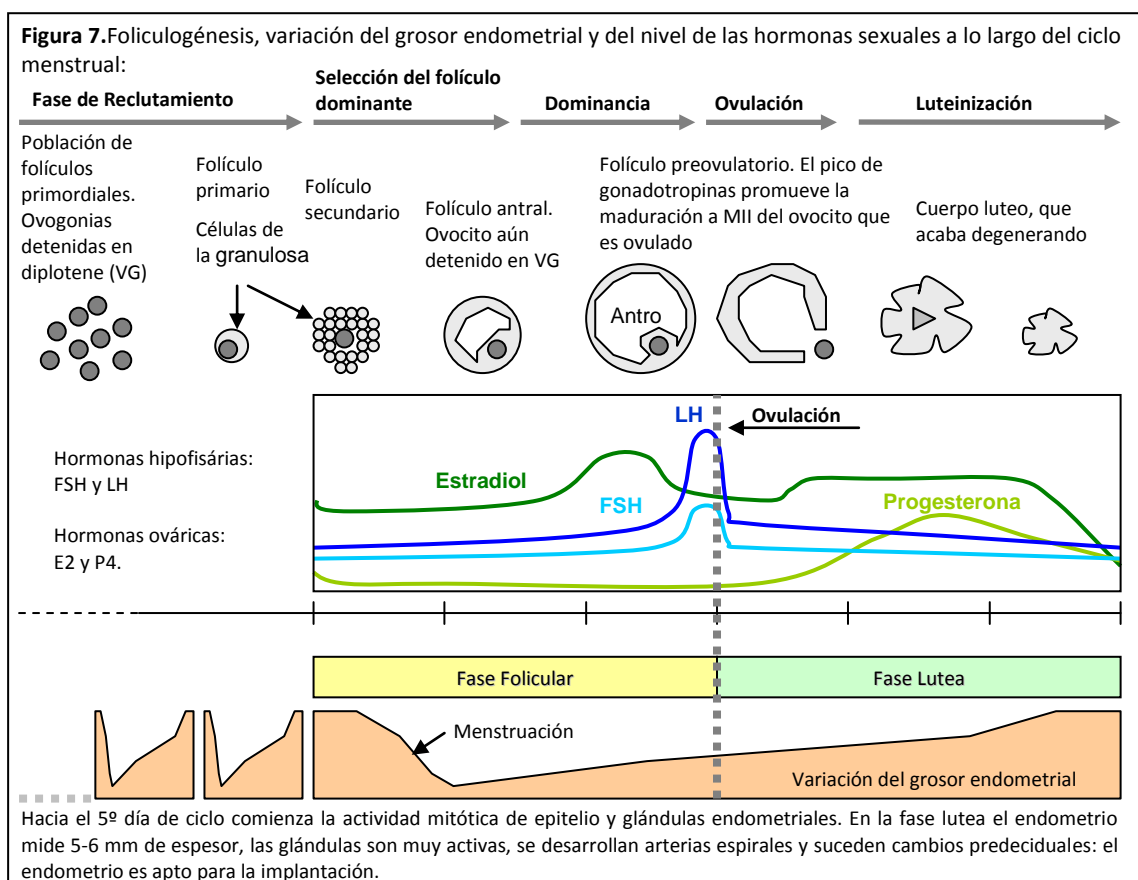
Las ovogonias entran en meiosis, independientemente de las gonadotropinas, entre el sexto y séptimo mes de embarazo y se detienen en el estadio de diplotene. En este momento los cromosomas están dispersos y rodeados de una membrana nuclear llamada vesícula germinal (VG). En la pubertad la meiosis se reanuda hasta la metafase de la segunda división meiótica (MII), dando lugar a ovocito maduros y con capacidad de ser fecundados. Esta maduración implica:

- condensación de los cromosomas y alineamiento de los mismos en la placa metafísica, gracias a la formación del huso meiótico (MS, *Meiotic Spindle*)
- disolución de la membrana nuclear
- segregación de cromosomas homólogos
- extrusión del primer corpúsculo polar.

La segunda división meiótica se completará una vez que el ovocito sea fecundado por un espermatozoide funcional.

## La foliculogénesis

El desarrollo y maduración de los ovocitos va ligado al desarrollo de las células que lo rodean e interaccionan con él (resumen en **figura 7**).



El **folículo primordial** está formado por el ovocito en estadio de VG rodeado por las células precursoras de las células foliculares. La gran población de folículos primordiales sirve de fuente de desarrollo de ovocitos durante toda la vida reproductiva de la mujer y se van reclutando en los sucesivos ciclos menstruales.



Los folículos primordiales pasan a ser **folículos primarios** cuando las células que rodean al ovocito se dividen y crecen, pasando a denominarse células de la granulosa. Cuando el ovocito ya está rodeado de más de una capa de células se denomina **folículo secundario**. El desarrollo y la maduración posterior del folículo dependen de las gonadotropinas. El tiempo estimado que tarda un folículo primordial en llegar a preovulatorio es de unos 150 días.

El desarrollo folicular continúa, y se forma una cavidad o antro entre las células de la granulosa por acción de la FSH (folículo antral temprano). Este folículo crece y forma un antro bien desarrollado pasando a denominarse **folículo antral preovulatorio**. Las células foliculares que lo rodean se dividen entonces en: células del cúmulo, más asociadas al ovocito, y células de la granulosa, que forman las paredes del folículo. La fase antral dura 60 días y en ella el ovocito alcanza su máximo diámetro.

En este momento los ovocitos aún continúan detenidos en diplotene, pero el pico preovulatorio de gonadotropinas induce la maduración del ovocito hasta la MII, y el cúmulo segrega ácido hialurónico, que se hidrata y embebe las células en una matriz mucilaginosa.

La selección del **folículo ovulatorio** se produce al final de la fase folicular. Varios folículos antrales tempranos progresan en su desarrollo, pero solo uno de ellos madurará y será ovulado, mientras que el resto entrarán en atresia. Las células de la granulosa y la teca del folículo ovulatorio continúan su diferenciación en el ovario tras la ovulación y forman el **cuerpo lúteo**, en un proceso denominado luteinización.

Al nacer una mujer tiene unos 2 millones de folículos primordiales que van entrando en atresia, y al llegar a la pubertad quedan unos 400.000. La atresia continúa a lo largo de la vida y solo alrededor de 500 se desarrollarán a ovocitos en MII y serán ovulados. La reserva ovárica, por lo tanto, va disminuyendo a lo largo de la vida hasta que tiene lugar la menopausia.

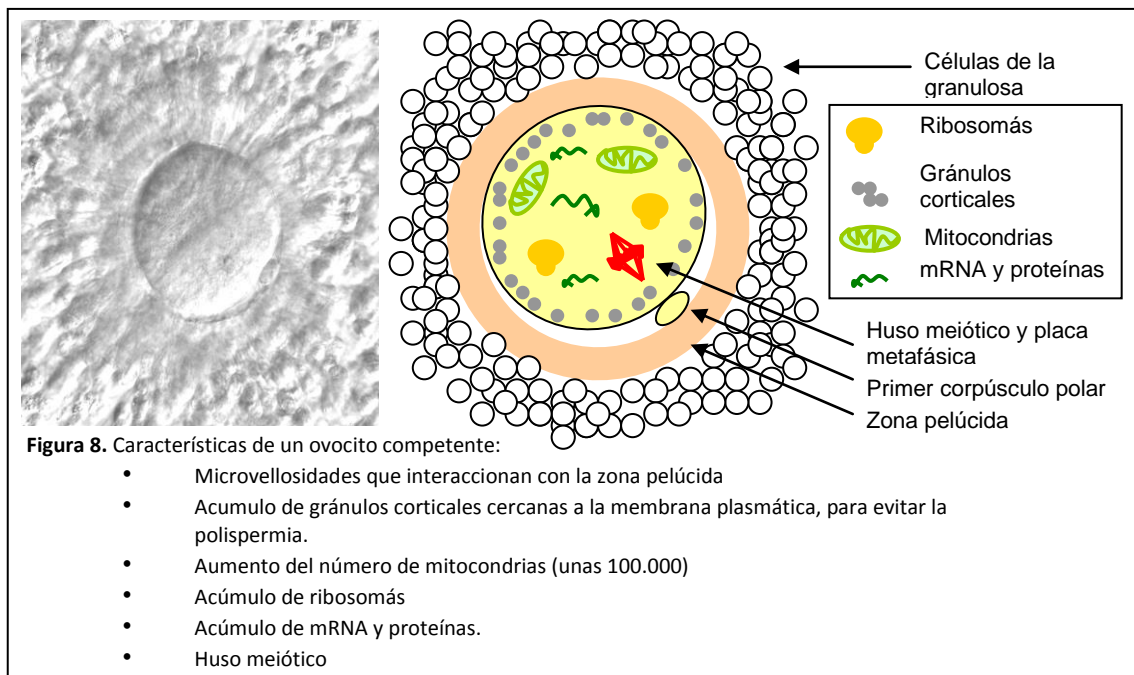
## La competencia ovocitaria

Como se ha explicado antes, existe una estrecha interacción entre el ovocito y las células somáticas que lo rodean, necesaria para que el ovocito crezca y madure. Esta relación se mantiene desde la gametogénesis hasta la maduración (Eppig et al. 2002). La competencia ovocitaria consiste en el crecimiento, maduración y adquisición de la maquinaria necesaria para el desarrollo temprano del embrión. Este proceso está muy ligado al correcto desarrollo del folículo. Un desarrollo embrionario temprano correcto depende de que esta unión tenga lugar de forma (Krisher and Bavister 1998).

La **maduración nuclear y citoplasmática** es fundamental para la adquisición de la competencia ovocitaria y tiene lugar en los estadios preantral y antral temprano, es decir, en las últimas fases de la foliculogénesis, cuando el ovocito y la granulosa forman un sincitio. Antes de la ovulación este tipo de uniones desaparecen para favorecer el proceso.

La conexión del folículo con el ovocito está implicada en la detención del ovocito en profase I, en la nutrición del ovocito y en la regulación de su expresión génica y síntesis de proteínas necesarias para el inicio del desarrollo embrionario.

Las células de la granulosa se introducen a través de la zona pelúcida y forman uniones tipo GAP con el ovocito. Estas uniones permiten el intercambio de moléculas, principalmente de la granulosa hacia el ovocito (Eppig 1994). También existen estas uniones entre las células de la granulosa. Los iones, aminoácidos y nucleótidos se equilibran así entre compartimentos, siendo esto fundamental para el crecimiento y maduración ovocitaria (Colonna et al. 1989). Además permiten el paso de moléculas reguladoras como las purinas o el AMPc, que intervienen en la regulación de la meiosis (Racowsky 1985). Estas uniones desaparecen cuando el folículo está maduro, quedando unidas solamente mediante microvellosidades, que se encargarían de suministrar nutrientes al ovocito y retirar catabolitos (Makabe et al. 2006)



El ovocito también participa en la regulación de las células de la granulosa y la función ovárica mediante la secreción de factores paracrinos a través de los espacios intercelulares (Eppig 2001). Participa activamente en la estereoidogénesis, induciendo la producción de estradiol e inhibiendo la producción de progesterona. El ovocito estimula la proliferación y diferenciación de la granulosa, y suprime la expresión del mRNA de los receptores de LH en la granulosa, evitando la luteinización precoz del folículo (Eppig 1998).

Las células del cúmulo incorporan glucosa del medio que las rodea, y mediante la glicolisis y forman piruvato que pasa al ovocito mediante las uniones GAP y así obtienen la energía necesaria para conseguir la competencia (Saito et al. 1994).

Los ovocitos maduros, capaces de ser fecundados, finalizar la meiosis, y sustentar el desarrollo temprano del embrión, presentan ciertas características citoplasmáticas, que los diferencian de un ovocito inmaduro, como se ve en la **figura 8**.

El líquido folicular, producido fundamentalmente por las células de la granulosa, contiene proteínas, citoquinas y factores de crecimiento importantes para

el desarrollo de ovocitos de buena calidad. Su composición es similar a la del plasma filtrado (Gosden and Faddy 1998).

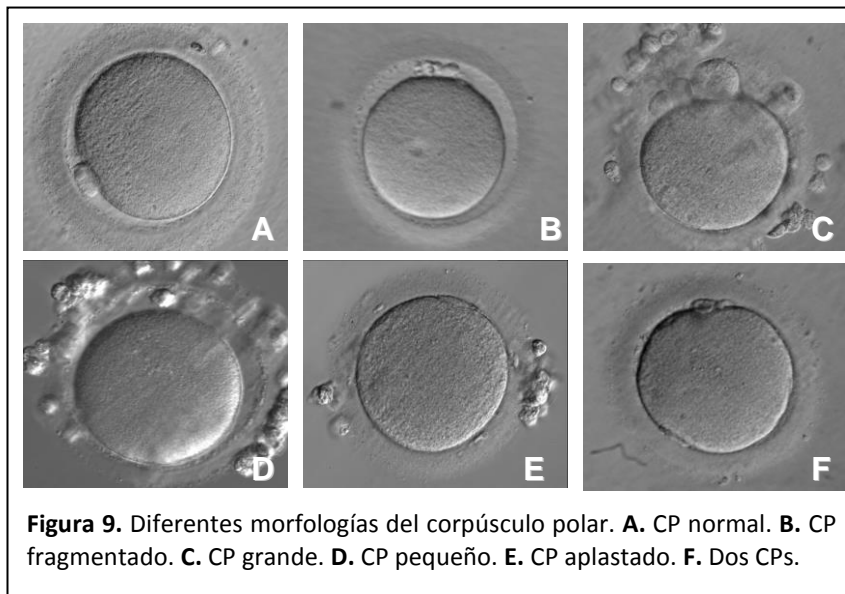
## **Calidad y dimorfismos ovocitarios**

La calidad y viabilidad del embrión en desarrollo depende tanto de la calidad del espermatozoide como de la del ovocito. El espermatozoide ha sido ampliamente estudiado, sin embargo la calidad ovocitaria es un tema aún controvertido, debido probablemente al bajo número de ovocitos de los que se dispone para investigar, comparado con el número de espermatozoides.

El ovocito aporta todo su citoplasma y la mitad del ADN al embrión, luego su importancia es muy grande. Cada vez hay más evidencias sobre la importancia de la apariencia citoplasmática y la presencia de un MS bien estructurado. La presencia de defectos en el ovocito puede dar lugar a defectos en la segregación cromosómica, causando embriones aneuploides (Battaglia et al. 1996)

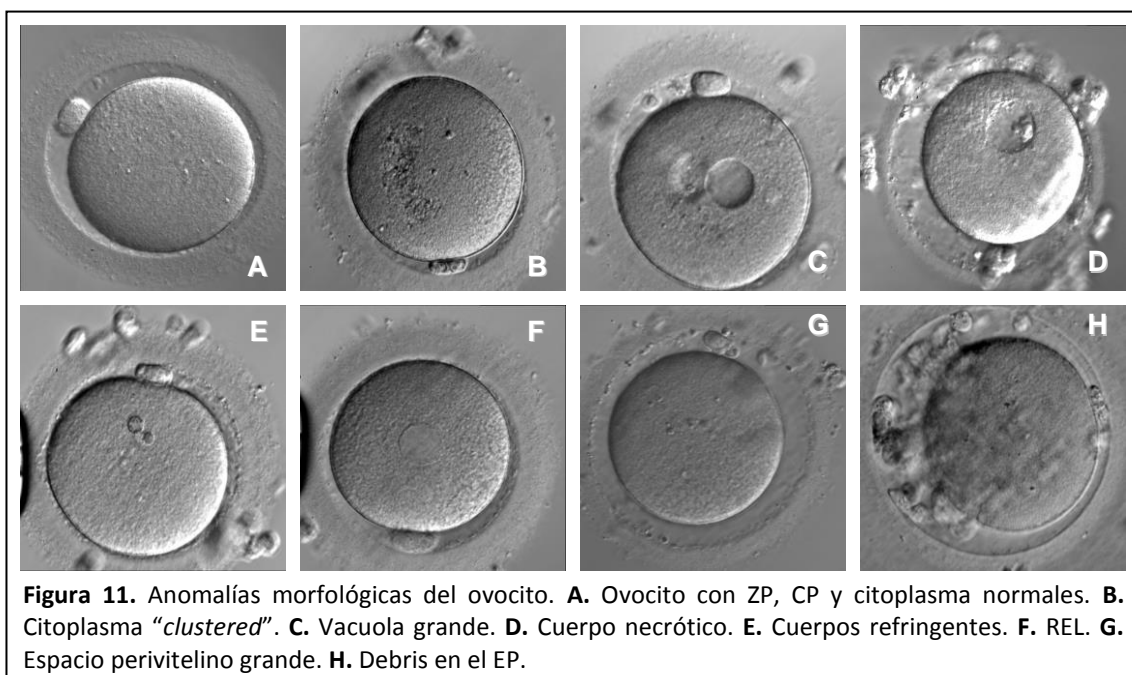
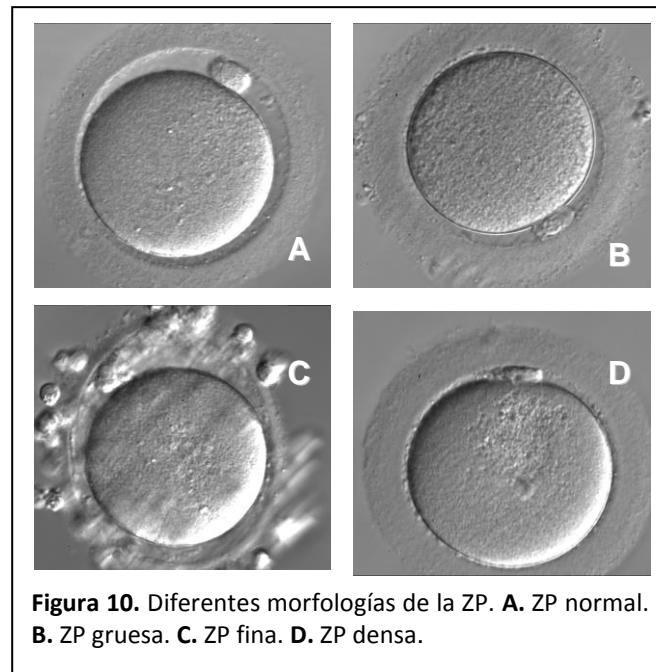
Los cambios microambientales debidos a cambios en la concentración de gonadotropinas que sufre el ovocito durante la foliculogénesis implican cambios metabólicos y estructurales en él (Makabe et al. 2006). En el laboratorio lo único que podemos hacer es observar el ovocito bajo el microscopio, y descubrir si tiene alteraciones citoplasmáticas o en el MS. Existen ciertas características morfológicas que están cobrando importancia últimamente, y aunque muchos piensan que los dimorfismos ovocitarios se deben a la estimulación ovárica (Balaban et al. 1998, Meriano et al. 2001, Van Blerkom and Henry 1992, Xia 1997) y que solo son pequeñas variaciones del aspecto sin importancia sobre la fecundación, calidad o implantación (Balaban and Urman 2006), otros afirman que las deficiencias citoplasmáticas pueden ser reflejo de importantes anomalías a nivel molecular. Los dimorfismos ovocitarios que observamos en el laboratorio de FIV pueden estar relacionados con la zona pelúcida, el citoplasma del ovocito o el corpúsculo polar.

- El **primer corpúsculo polar**: el CP normal es único, no está fragmentado y es pequeño pero fácilmente visible a la lupa. Las anomalías referentes al CP más frecuentes son: que este fragmentado o aparezca más de uno, que sea amorfo, esté aplastado, o que sea muy grande o muy pequeño (Ver fotos **figura 9**).



- La **Zona Pelúcida** debe tener un grosor entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ , siendo de mal pronóstico una ZP demasiado fina o gruesa. Debe ser redondeada, y si es elongada el ovocito en su interior debe ser redondo ya que si ambos son elongados el embrión podría tener problemas de desarrollo. (Ver fotografías **figura 10**). Las ZP oscuras o de formas anormales no están asociadas a menor fecundación o peor calidad embrionaria tras ICSI (Balaban et al. 1998)
- El **citoplasma y el espacio perivitelino**. En teoría, un ovocito maduro en MII de buena morfología, debe tener un citoplasma claro y homogéneo. Con granulosidad moderada y sin inclusiones citoplasmáticas (Ebner et al. 2006), aunque parece que tras la estimulación ovárica pueden mostrar una amplia variedad de fenotipos (Balaban et al. 1998, Balaban and Urman 2006, Van Blerkom and Henry 1992). Así, solamente alteraciones citoplasmáticas severas,

como el “*clustering*”, el retículo endoplasmático liso o las vacuolas pueden considerarse anomalías (Meriano et al. 2001, Otsuki et al. 2004) siendo el resto citoplasmas fenotípicamente heterogéneos. Se acepta, sin embargo, que las alteraciones, tanto citoplasmáticas como extra-citoplasmáticas, tienen un efecto deletéreo en la calidad del embrión. (Ver **figura 10**).



## **F. EMBRIONES EN EL LABORATORIO DE FIV**

Como se ha explicado antes, la finalidad de un ciclo de FIV es conseguir embriones de buena calidad, que implanten y se desarrollen dando lugar a un nacimiento viable. Los ovocitos, tras ser fecundados mediante FIV o ICSI, se cultivan en el laboratorio bajo estrictas condiciones de humedad, temperatura y esterilidad. Desde los comienzos de las TRA los medios de cultivo han evolucionado mucho, y hoy en día son altamente complejos y se diseñan basándose en las secreciones del tracto genital femenino (Lobo 2003)

En el momento de la ovulación, el ovocito tiene almacenados suficientes transcritos como para llevar a cabo su metabolismo durante las primeras fases del desarrollo embrionario, antes de la activación de su propio genoma. Las condiciones de cultivo influyen en la transcripción y la traducción y, si estas son subóptimas, disminuyen el metabolismo embrionario y comprometen su viabilidad (Cobo et al. 2008b, Coticchio et al. 2006, Rienzi et al. 2004).

En un FIV convencional, la fecundación ocurre rápidamente tras la inseminación de los ovocitos. Después tienen lugar una serie de sucesos y divisiones celulares que deben tener lugar en unas franjas horarias determinadas. Los embriones con buenas tasas de división tienen mayor potencial implantatorio.

A continuación, se resume brevemente lo que ocurre tras la fecundación, y lo que vemos en el laboratorio de FIV:

Entre las 17 y las 20 horas post-inseminación (PI) podemos ver en el microscopio como han aparecido los pronúcleos (PN), y alrededor de las 30 horas PI vemos que el embrión ha alcanzado el estadio de dos células. Entre las 40 y las 50 horas PI el embrión debe tener 4 células. Esta fase se observa la mañana del día 2 de desarrollo. En este momento comienza la activación genómica del embrión, que tarda 24 horas en completarse. A partir del tercer día de desarrollo los embriones ya utilizan sus propios

transcritos, y su metabolismo ya no depende de las reservas ovocitarias. La mañana del día 3 de desarrollo embrionario cada una de las 4 células del embrión deben haberse dividido, por lo que observaremos 8 blastómeras y, con suerte, otros parámetros indicativos de buena salud embrionaria, como una baja tasa de fragmentación, ausencia de multinucleación en las blastómeras o el inicio de compactación entre las células. Sobre las 96 horas PI se debe observar una mórula compacta (sobre las 32 células) y en la mañana del día 5 deberíamos poder ver que ha comenzado la formación del blastocisto, que se expandirá a lo largo de los días 5 y 6 para acabar eclosionando. En el blastocisto podemos diferenciar claramente dos estructuras, la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (TE), que también deben estar bien conformados, con un número de células adecuado y buena estructura general (ver **figura 11**). La eclosión del blastocisto es un proceso mecánico, por la expansión del TE, y también enzimático. Cuando un blastocisto de buena calidad abandona la ZP que antes lo protegía, ya está preparado para implantar en un endometrio receptivo.

**Figura 11: Desarrollo embrionario ideal:** A. Ovocito MII. B. Zigoto correctamente fecundado con 2PN. C. Embrión con dos células simétricas y mononucleadas. D. Embrión de 4 células simétricas sin fragmentación. E. Embrión de 8 células simétricas. F. Mórula compacta. G. Blastocisto cavitado con TE y MCI bien definidas. H. Blastocisto expandido de muy buena calidad.





## **Capítulo 2**

### **LA CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES**



## **A. DESARROLLO HISTÓRICO DE LAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN**

La primera criopreservación de gametos de la que tenemos datos sucedió en 1776, cuando Lázaro Spallanzani realizó una congelación y descongelación con buena movilidad de una muestra de semen. Desde entonces se han desarrollado muchos y diferentes protocolos con la finalidad de criopreservar embriones y gametos humanos con buenos resultados, hasta llegar a los procedimientos que realizamos a diario en los laboratorios de FIV, conscientes de las ventajas que aporta a la actividad clínica el hecho de tener un buen programa de criopreservación. Algunos de los hitos más importantes en el desarrollo de estos protocolos fueron los siguientes:

- El glicerol como CPA se describió por primera vez en 1949 (Polge et al. 1949).
- En 1954 se publicó el primer niño nacido tras el uso de semen congelado (Bunge and Sherman 1954).
- Después se comenzó a utilizar el DMSO como CPA en la congelación de embriones (Whittingham et al. 1972).
- El primer niño nacido de la transferencia de un embrión congelado en día 3 con DMSO tuvo lugar 11 años más tarde (Trounson and Mohr 1983).
- Cohen y sus colaboradores publicaron en 1985 el nacimiento del primer niño nacido de la transferencia de un blastocisto congelado (Cohen et al. 1985).
- La primera vez que se publicó la aplicación exitosa de la técnica conocida como vitrificación fue ese mismo año, y se aplicó a embriones de ratón (Rall and Fahy 1985).
- Como ya se ha comentado previamente, el primer niño nacido tras la descongelación lenta de ovocitos se la debemos a Chen (Chen 1986). 13 años después se publicó el primer nacimiento tras la vitrificación de ovocitos usando EG y Sacarosa (Kuleshova et al. 1999).

- Y por último, en 2003 se presentó el Cryotop como método de vitrificación con alta tasa de supervivencia (Katayama et al. 2003)
- Desde entonces la evolución de los protocolos ha sido vertiginosa, consiguiéndose unos resultados difíciles de imaginar en un principio, que hacen que los programas de criopreservación sean muy eficaces y estables en sus resultados.

## B. ESTRATEGIAS DE CRIOPRESERVACIÓN

El objetivo fundamental de todo protocolo de criopreservación es aportar soluciones externas a las células a congelar que les ayuden a sobrellevar el proceso, reduciendo al mínimo los daños ocasionados por el mismo. Existen diversos factores que pueden influir en los resultados del procedimiento de criopreservación, como la especie, el estadio de desarrollo, la calidad embrionaria o la manipulación previa. Existen dos grandes estrategias de criopreservación: los procedimientos de equilibrio y los de no equilibrio.

### **En los procedimientos de equilibrio o congelación lenta:**

En este tipo de protocolos, las células son enfriadas por debajo de 0°C, **se forma hielo en el medio extracelular** (gracias al “*seeding*”) y aumenta la concentración de solutos disueltos por la eliminación de agua libre. El agua intracelular sale de cada célula para equilibrar la solución hipertónica en la que se encuentra y así se limita la perjudicial formación de hielo intracelular, que es incompatible con la supervivencia. Los efectos adversos derivados de la congelación y descongelación lenta son principalmente dos: la formación de hielo intracelular (daño mecánico) y el exceso de deshidratación celular (Leibo 1986).

En los procedimientos de equilibrio la velocidad de enfriamiento es muy lenta, y las células pueden responder osmóticamente al cambio de temperatura a través de la deshidratación. Se requieren congeladores programables para llevar a cabo el proceso, y los ovocitos y embriones ovocitos pasan por un rango de temperatura crítico en el que se produce el efecto “*chilling*”. Los agentes crioprotectores (CPA) se utilizan en muy bajas concentraciones, con lo que los posibles efectos tóxicos, en teoría, serían menores.

La optimización de los protocolos de congelación lenta de embriones ha permitido mejorar mucho los resultados obtenidos tras la descongelación, sin

embargo, la congelación lenta de ovocitos y blastocistos no ha conseguido llegar a presentar unos resultados estables y aceptables. Sin embargo el desarrollo de los protocolos de no equilibrio, como la vitrificación, ofrece nuevas y prometedoras expectativas para los programas de criopreservación de los centros de RA.

### **Procedimientos de congelación de no equilibrio (Vitrificación):**

En este tipo de protocolos no es necesario establecer el equilibrio osmótico antes los ambientes intra y extracelular a lo largo del periodo de enfriamiento de las células (Mazur 1990). Por tanto, los procedimientos basados en este principio permiten la utilización de velocidades de enfriamiento rápidas hasta alcanzar la temperatura del nitrógeno líquido (NL), y así el medio intracelular no cristaliza, sino que adquiere una consistencia vidriosa, de ahí el nombre “vitrificación”.

Los protocolos de vitrificación han sufrido diferentes modificaciones a lo largo de los años. La mezcla 1:1 de etilen glicol (EG)-dimetilsulfóxido (DMSO) ha mostrado ser altamente efectiva. Pero la innovación más relevante ha sido la introducción del “mínimo volumen” como estrategia para incrementar la velocidad de la vitrificación y con ello reducir la concentración de CPA y consecuentemente su toxicidad. Más adelante, en la **Figura 13** se muestra la composición química de los CPA utilizados en los protocolos de vitrificación.

En la vitrificación **no hay formación de hielo a nivel intra o extracelular**, sino que las células se deshidratan osmóticamente antes del enfriamiento, mediante el tratamiento con una solución de CPA altamente concentrados (del orden de 6-7M). Se han realizado diferentes estudios encaminados a establecer la concentración adecuada de CPA de manera que sea alta para conseguir la vitrificación, pero mínima para disminuir la toxicidad.

El incremento en la velocidad ofrece la ventaja de reducir el estrés osmótico que causa la alta concentración de CPA, además de evitar el paso por el rango de

temperatura de +15°C y -5°C, en el que curre el "*Chilling injury*". La desvitrificación, tiene lugar en estas mismas condiciones, llevando las muestras de -196°C a 37°C, siendo la velocidad de desvitrificación de 442°C por segundo aproximadamente.





## C. ESTADO ACTUAL DE LAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES

Leyre Herrero, Mónica Martínez y Juan Antonio García Velasco.

*Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* (Factor de impacto 2,370)

Volumen 23, Páginas 245-250. 2011.

La criopreservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas (-196°C N2 líquido) para ser almacenados y conservados, manteniendo su viabilidad por tiempo indefinido. Cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas quedan detenidas.

La criopreservación es una herramienta de uso común y de gran importancia en RA, ya que, como ya se ha comentado, permite sacar el máximo rendimiento a los ciclos de fecundación *in vitro*, mediante la transferencia de embriones congelados. La introducción de la vitrificación y la posibilidad de criopreservar ovocitos abre un mundo de nuevas indicaciones a los especialistas en RA.

La congelación lenta, protocolo de uso tradicional en todos los laboratorios de FIV, está siendo sustituida gradualmente por la vitrificación, debido a los resultados obtenidos con esta técnica en blastocistos y ovocitos.

En esta revisión se resumen las publicaciones más recientes sobre este tema, y otros aspectos de interés relacionados.

### **Experiencia clínica con la congelación lenta de ovocitos**

En cuanto a congelación lenta de ovocitos, desde la primera gestación conseguida con ovocitos congelados publicada por Chen y sus colaboradores (Chen 1986), el análisis de la literatura acerca de los resultados obtenidos con la congelación lenta, se hace un poco difícil, debido principalmente a que existe una heterogeneidad considerable en cuanto al protocolo de congelación aplicado, los CPA utilizados, su concentración, escaso número de ovocitos utilizados en los estudios, naturaleza de los mismos (envejecidos, madurados *in vitro*, fallos de fecundación), etc.

En los últimos años, los protocolos de congelación lenta han evolucionado considerablemente y se han introducido varias modificaciones relacionadas principalmente con la mezcla de CPA.

El primer informe acerca de un nacido vivo tras la congelación de ovocitos utilizando el 1,2-Propanodiol (1,5 M PROH) y sacarosa (0,2M) como CPA fue publicado por Porcu (Porcu et al. 1997). Posteriormente se publicaron varios casos clínicos, que resultaron en gestaciones y nacimientos utilizando esta misma técnica.

La utilización de estos protocolos fue relativamente ineficiente debido a la baja tasa de supervivencia y al limitado potencial de los ovocitos que sobrevivieron. Estos protocolos fueron modificados, intentando mejorar su eficacia. Una de estas modificaciones, fue elevar la concentración de sacarosa, con el fin de aumentar la ratio de deshidratación y con ello, disminuir las posibilidades de cristalización durante el proceso. Las primeras evidencias a este respecto, fueron publicadas por Fabbri (Fabbri et al. 2001).

Otra modificación significativa a los protocolos de congelación lenta utilizando PROH y sacarosa, ha sido la sustitución los iones de sodio en el medio base, por otro catión: la colina. Esta aproximación fue testada inicialmente en ratón, consiguiéndose muy buenos resultados de supervivencia (90%) y gestación (40%) (Stachecki et al. 2002).

En cuanto a la congelación lenta de ovocitos, un meta-análisis realizado por Oktay y colaboradores concluyó que el éxito real de la congelación lenta a través de los diferentes protocolos es de sólo el 2,2% por embrión generado; el 2,3% de tasa de gestación por ovocito descongelado; o del 20,1% de tasa de gestación clínica por transferencia (Oktay et al. 2006).

### **Experiencia Clínica con la Vitrificación de ovocitos**

La historia de la aplicación clínica de la vitrificación es más corta que la de la congelación lenta, pero de manera semejante, los protocolos de vitrificación también han sufrido diferentes modificaciones a los largo de los años. Por una parte, se han ensayado diferentes mezclas de CPA. La mezcla 1:1 de etilenglicol (EG)-dimetilsulfóxido (DMSO) ha mostrado ser altamente efectiva y la introducción del “mínimo volumen” como estrategia para incrementar la velocidad de la vitrificación y reducir la concentración de CPA y su toxicidad, como ya se ha explicado previamente.

El primer RNV publicado tras la utilización de un sistema de vitrificación abierto (*open pulled System*, OPS) fue publicado por Kuleshova y colaboradores (Kuleshova et al. 1999). Muchas son las publicaciones que hablan de un dispositivo recientemente diseñado, llamado Cryotop (Kuwayama et al. 2005a, Kuwayama et al. 2005b)), que consiste en una lengüeta de polipropileno, unida a un mango de plástico, y equipada con una pajuela que sirve de protección durante la manipulación y almacenaje. El volumen de medio vitrificado con este dispositivo es tan pequeño (cerca de 0,1  $\mu$ l) que permite una velocidad de enfriamiento de  $-23.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Utilizando el cryotop, Kuwayama (Kuwayama et al. 2005b), ha obtenido un

91% de tasa de supervivencia con ovocitos humanos, 81% de tasa de división , y 50% tasa de blastocistos, con un 41% de tasa de gestación por transferencia embrionaria, resultando en 11 nacidos vivos. Cuando se publicó esta revisión ya habían nacido más de 50 niños a través de esta técnica a manos de este grupo (Kuwayama et al. 2007).

Una publicación ha reportado un 90,1% de supervivencia y un 34,1% de tasa de gestación, habiendo conseguido 34 nacidos vivos hasta la fecha. Más recientemente, otro grupo ha publicado sus resultados obtenidos con el Cryotop (Antinori et al. 2007). La tasa de supervivencia publicada por estos autores es del 99,4% con tasas de fecundación, gestación e implantación del 9,9%, 32.5% y 13,2% respectivamente.

En una publicación de nuestros compañeros de IVI Valencia se comparó el desarrollo embrionario obtenido con ovocitos vitrificados y frescos obtenidos simultáneamente (Cobo et al. 2008a). La tasa de supervivencia fue del 97% (224/231 ovocitos). Los resultados obtenidos en fresco fueron similares a los obtenidos tras la vitrificación, lo que hizo que nuestro grupo optase por la vitrificación como método de criopreservación de rutina desde entonces.

Se ha creado un banco de ovocitos de donante, para el beneficio de las pacientes inscritas en nuestro programa de ovodonación, y ya no es necesario que las pacientes entren en lista de espera, ni la sincronización donante-receptora. La gestión de la donación de ovocitos en nuestras clínicas ha mejorado sustancialmente gracias a la vitrificación de ovocitos.

En el artículo a continuación se ve resumido como muchos autores han publicado comparaciones de ambos protocolos de criopreservación prospectiva y randomizadamente, concluyendo que la vitrificación es mejor opción, ya que induce menor daño celular, ofrece mejores tasas de supervivencia, y mejores resultados en los ciclos de FIV llevados a cabo tras la desvitrificación. También se ha analizado como es el desarrollo embrionario tras la aplicación de ambos protocolos. En general la vitrificación parece ofrecer mayor potencial implantatorio a los ovocitos, haciéndolos comparables a ovocitos en fresco.

La repolimerización del MS del ovocito tras la criopreservación también se ha publicado que es más rápida tras la desvitrificación. Esta característica del ovocito se puede observar con un microscopio de luz polarizada, o también usando microscopía confocal, que da mayor detalle, pero cuyo acceso desde los laboratorios de FIV es menor. El momento en que se realiza la microinyección tras la descongelación también es un tema ampliamente estudiado en las últimas publicaciones, y los autores coinciden en que el mejor momento es 3 horas tras la descongelación, dado que la gran mayoría de husos meióticos están repolimerizados.

### **Criopreservación de cigotos**

En los últimos años la criopreservación de cigotos no ha sido objeto de muchas investigaciones, y los dos casos comentados en el artículo, la criopreservación de los cigotos, obedece a necesidades de los ciclos de las pacientes estudiadas. Normalmente, o se criopreservan ovocitos, o se criopreservan embriones, ya que la calidad de los cigotos es difícil de evaluar en comparación con la información que nos dan los embriones.

### **Criopreservación de embriones y blastocistos**

También los dos protocolos de criopreservación han sido comparados por muchos autores, en casos de ciclos convencionales de ICSI, y también en ciclos de maduración *in vitro* de ovocitos. La conclusión a la que llegan estos autores es que la vitrificación no ofrece mayores tasas de gestación, pero sí mayores tasas de supervivencia, tanto en embriones como blastocistos.

Respecto al tipo de soporte utilizado, los mejores resultados en embriones se han obtenido utilizando sistemas abiertos. Y sobre en qué momento del desarrollo embrionario es mejor realizar la criopreservación, hay controversia, aunque lo que está claro es que en manos expertas, la supervivencia tras la descongelación o

desvitrificación es buena, y ahí reside la base de un programa de criopreservación eficaz.

También se ha publicado en los últimos años sobre el impacto del tiempo de almacenamiento de los embriones en su tasa de supervivencia. En teoría el tiempo que pueden estar los embriones almacenados en NL es ilimitado, siempre que las condiciones se mantengan, pero es cierto que no tenemos datos de embriones que fueron congelados hace más de 20 años.

Existen casos en los que un embrión se descongela, y tiene que volver a ser congelado por segunda vez. Los estudios que se han publicado recientemente sobre este tema encuentran resultados comparables tras la transferencia de embriones que han sido criopreservados una y dos veces. Obviamente no es lo ideal, pero parece que se descarta que esta doble congelación tenga un efecto deletéreo sobre los embriones y los resultados del ciclo.

Respecto a los resultados perinatales de las transferencias de congelados, parece que el impacto es comparable al estudiado tras la transferencia de embriones que provenían de ciclos de FIV en fresco, aunque los resultados son limitados.

### **Aspectos relacionados con la seguridad en la criopreservación**

Este es un tema que causa bastante preocupación, sobre todo entre los usuarios de la vitrificación en sistemas abiertos, en los que las muestras están en contacto directo con el NL en el que se almacenan. Aunque nunca se ha descrito, hay autores que temen que se pueda dar una contaminación cruzada entre las muestras de pacientes almacenadas en el mismo tanque de NL. A este respecto se han propuesto dos posibles soluciones:

1. El almacenaje en **vapores de nitrógeno**, y no en NL. Parece que las condiciones de vapor de nitrógeno permiten el almacenamiento y no

comprometen la supervivencia tras la desvitrificación, ni los resultados de los ciclos.

2. Otra posibilidad es la **esterilización del NL** mediante rayos ultravioletas.

Pero lo único que evita con seguridad la contaminación son los sistemas de vitrificación cerrados, en los que la muestra no está en contacto directo con el NL, pero cuyos resultados generales son peores que los obtenidos con sistemas abiertos. Hasta la fecha no se han descrito casos de contaminación, por lo que es probable que los sistemas abiertos y los tanques de NL se sigan utilizando en los laboratorios de FIV.





# Current status of human oocyte and embryo cryopreservation

Leyre Herrero, Mónica Martínez and Juan A. Garcia-Velasco

IVI-Madrid, Rey Juan Carlos University, Madrid, Spain

Correspondence to Juan A. Garcia-Velasco, MD, IVI Madrid, Avenida del Talgo 68, 28023 Madrid, Spain  
Tel: +34 91 180 29 00;  
e-mail: juan.garcia.velasco@ivi.es

**Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**  
2011, 23:245–250

## Purpose of review

To summarize recent advances in oocyte and embryo cryopreservation techniques and outcomes.

## Recent findings

Vitrification is gradually replacing slow freezing due to a better survival rate after thawing. Most units use vitrification for both oocyte and blastocyst cryopreservation, as these two biological structures did not perform very well with slow freezing technique. Basic experiments show that cellular damage seems lower after vitrification. Taken all together, this is helping vitrification to be expanding rapidly, and new clinical indications are being incorporated as well (i.e., fertility preservation).

## Summary

Cryopreservation has been used as a complement to IVF, and recent publications indicate that pregnancy rates achieved with frozen oocytes and embryos are comparable with those achieved in fresh cycles. Multiple publications studying oocyte and embryo physiology during cryopreservation have been published recently; however, larger studies are needed to verify the efficacy of new cryopreservation techniques. Vitrification is a simple and robust technique that is being incorporated into the majority of IVF units, mainly for oocyte and blastocyst cryopreservation.

## Keywords

cryopreservation, embryo, oocyte, slow freezing, vitrification

Curr Opin Obstet Gynecol 23:245–250  
© 2011 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins  
1040-872X

## Introduction

Cryopreservation has always played a central role in assisted reproductive treatment (ART). Since the first successful sperm cryopreservation [1] and, 30 years later, embryo cryopreservation [2], these techniques have become routine in ART laboratories. Later, Cohen *et al.* [3] reported the first baby born after a frozen-thawed blastocyst transfer, and just 1 year later Chen [4] published the first baby born after oocyte cryopreservation.

Embryo cryopreservation has been used for many years, and there is sufficient published evidence regarding outcomes to evaluate efficiency. Embryo cryopreservation has decreased the number of fresh embryos transferred, maximizing effectiveness of the IVF cycle. Similarly, embryo cryopreservation is a crucial tool in cases of cancelled embryo transfer due to ovarian hyperstimulation risk, endometrial bleeding, elevated serum progesterone levels on the day of triggering, or any other unplanned events.

The history of oocyte cryopreservation implementation is more recent. The largest published experience came from Italy due to their large experience, partly forced by their legal requirements that did not allow them to

fertilize more than three eggs, and was based on slow freezing methods [5,6]. Nowadays, vitrification has been demonstrated to be also a highly effective freezing method [7–13,14\*,15,16]. Numerous clinical indications for oocyte cryopreservation have been recognized: fertility preservation in women at risk of losing fertility due to oncological treatment or chronic disease [17], patients postponing childbirth until a later age [18], patients concerned with ethical issues of embryo cryopreservation, or a safe and reliable source for oocyte donation [13,19].

Cryopreservation protocols have undergone continuous modifications in order to minimize possible adverse effects upon oocytes and embryos, such as ice crystal formation, which can lead to cell damage [20]. The use of cryoprotectant agents (CPA) like ethylene glycol, propylene glycol, glycerol, dimethyl sulfoxide or sucrose, that lead to cell dehydration replacing intracellular water, will help to solve this problem.

Oocyte cryopreservation in particular represents a great challenge in ART [21]. The oocyte has a very special structure that leads to complex difficulties associated with its cryopreservation. The plasma membrane permeability to CPA and water compromise the survival rate

[22] and the sensitivity of the meiotic spindle to temperature could compromise correct chromosomal segregation [23,24].

Slow freezing has traditionally been the preferred method of embryo cryopreservation in IVF laboratories. These protocols combined controlled cooling rates with low CPA concentrations. On the contrary, vitrification has been recently described as a revolutionary technique that combines high CPA concentrations with extremely fast cooling rates, and its use has increased greatly, especially for blastocyst and oocyte cryopreservation [25]. The main difference between slow freezing and vitrification is that in the vitrification procedure the oocyte/embryo and also the surrounding solution solidify in an amorphous structure similar to glass, without ice formation (Figs 1 and 2).

In this review, we will summarize recent evidence including our own experience concerning oocyte and embryo cryopreservation.

### Slow freezing and vitrification of oocytes

In the last 2 years, many authors have compared these two cryopreservation methods. Smith *et al.* [26] published a prospective study in patients with ethical concerns about embryo cryopreservation. They decided to vitrify or freeze their supernumerary oocytes between 2005 and 2009. Seventy-eight of 230 patients that cryopreserved their oocytes did not get pregnant. Survival rate was higher in the vitrification group (75% vs. 65%;  $P=0.01$ ), fertilization rate was also higher (77% vs. 67%;  $P=0.03$ ), and clinical pregnancy rate was better as well in the vitrification group (38% vs. 13%;  $P=0.02$ ). This prospective study that included 587 cryopreserved oocytes

### Key points

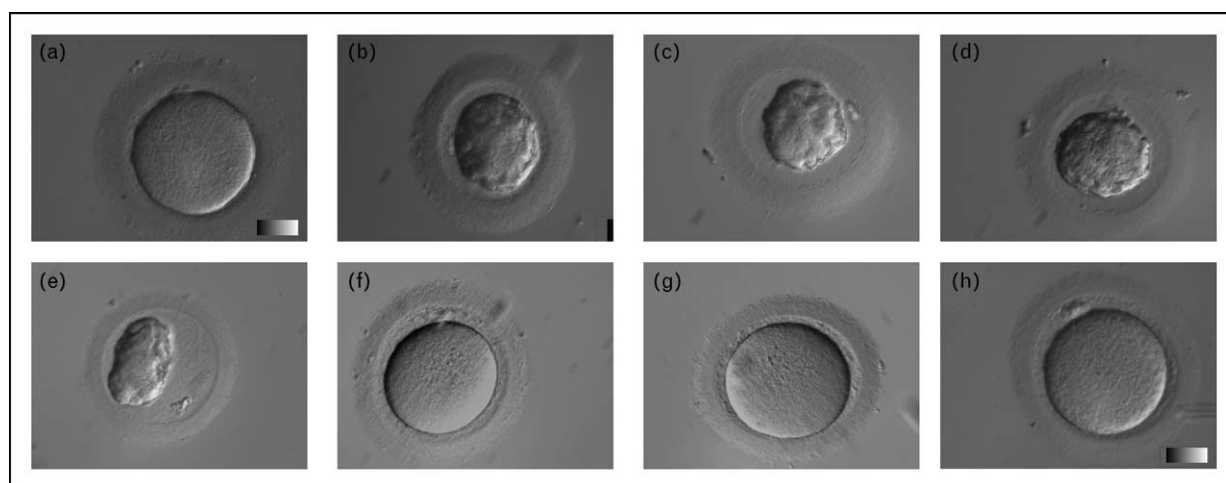
- Vitrification induces less cellular damage to the oocyte than slow freezing.
- Both techniques may offer good results in experienced hands, although vitrification results in higher oocyte survival rates, and most groups report better outcomes with vitrification than with slow freezing.
- Blastocyst vitrification yields consistently excellent implantation rates, something not observed with previous freezing/thawing methods.

concluded that vitrification was a better option than slow freezing for oocyte cryopreservation.

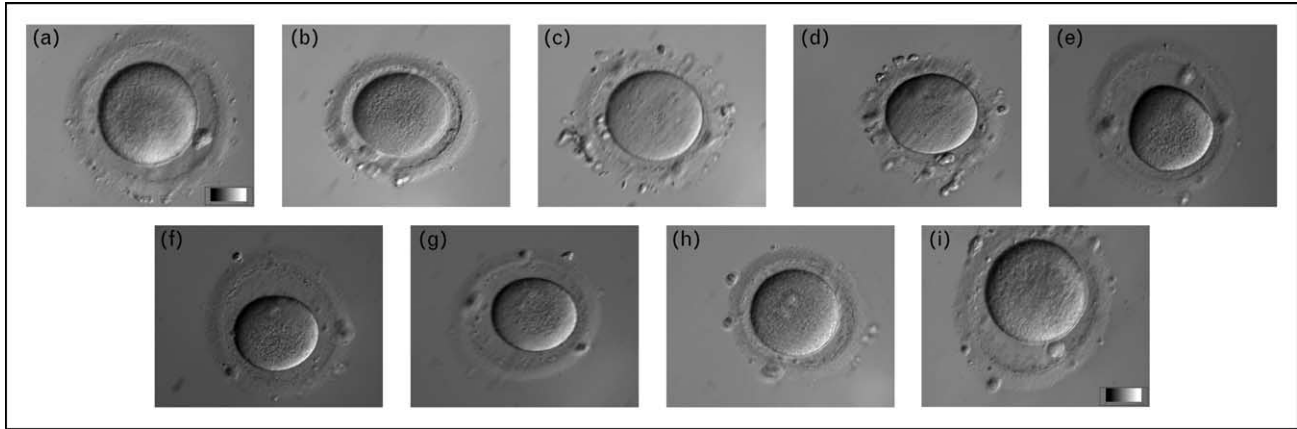
Excellent results after vitrification have been shown also by Kim *et al.* [16]. They found that vitrification of oocytes belonging to fertile women resulted in higher pregnancies and implantation rates after 6 months of cryopreservation. They achieved 81% survival rate, 80% pregnancies and 65% live birth rate. This is in accordance with our recently published randomized controlled trial, in which we showed that fertilization, implantation, and pregnancy rates from fresh donor oocytes or vitrified/warmed oocytes are absolutely comparable [27\*\*], suggesting that cellular competence is not altered after vitrification when oocytes come from young, healthy women.

Spindle repolymerization after different cryopreservation protocols and temperatures, using donated supernumerary oocytes, has been recently evaluated by Ciotti *et al.* [28]. The number of oocytes evaluated in each group was limited, but they found that vitrification using media at 37°C showed faster spindle repolymerization compared

**Figure 1** Volume changes during vitrification and rewarming procedure



(a) Oocyte after decumulation; (b) Oocyte in ES1; (c) Oocyte in ES2; (d) Oocyte in ES3; (e) Oocyte in DS; (f) Oocyte in WS1; (g) Oocyte in WS2; (h) Oocyte after cryopreservation process.

**Figure 2** Volume changes during slow cooling procedure

(a) Oocyte after decumulation; (b) Oocyte in FS1; (c) Oocyte in FS2; (d) Oocyte in FS3; (e) Oocyte in TS1; (f) Oocyte in TS2; (g) Oocyte in TS3; (h) Oocyte in TS4; (i) Oocyte after cryopreservation process.

with vitrification using media at different temperature or with slow freezing.

Molinari *et al.* [29] studied slow freezing-induced damage of the meiotic spindle and zona pellucida, and its relationship with clinical characteristics. They found that the zona pellucida, specially the inner layer, lost its structural organization and became thicker. Also, the meiotic spindle appeared less organized after slow freezing [29].

Although evaluation by polarized light is a satisfactory tool, confocal microscopy analysis proved much greater detail in studying the spindle. Using this technique, Bromfield *et al.* [30] found that slow freezing led to spindle disassembly. That was reversed 1 h after thawing, but interestingly, they observed that it was not sustained 2 and 3 h after thawing. Coticchio *et al.* [31] using microscopy to assess meiotic spindle and chromosome organization in oocytes after vitrification noted that the oocytes maintained their spindle with a bipolar organization, but chromosome alignment appeared to be partly compromised.

Grifo and Noyes [12] published a small series of 23 patients that cryopreserved their oocytes by either slow-freezing or vitrification. Fertilization and blastocyst formation resulted in significantly higher rates after slow freezing of the oocytes (84% vs. 75% fertilization and 52% vs. 35% blastocyst formation rate;  $P=0.04$  and  $0.02$ , respectively), but survival rate was similar in both protocols, suggesting that slow freezing in experienced hands may yield good results.

We recently published a randomized sibling donor oocyte study [14<sup>\*</sup>] comparing slow freezing and vitrification, and we found a higher survival rate and higher spindle

recovery after vitrification when compared with slow freezing (86.8% vs. 50% survival rate,  $P<0.0001$ ; 93.5% vs. 72% of meiotic spindle presence 3 h after thawing,  $P=0.01$ ). The survival rate after slow freezing was lower than published by other groups, most likely due to our limited experience with this protocol. We also analyzed DNA fragmentation by TUNEL assay after thawing, but no fragmentation was detected after either method. Kader *et al.* [32] evaluated postthaw DNA integrity of mouse blastocysts after cryopreservation, and found both techniques induced DNA fragmentation, and that the more expanded the blastocyst, the greater was the susceptibility to DNA damage during the process.

Chen and Yang [24] recently reviewed the pros and cons of vitrification vs. slow freezing. They concluded that, overall, survival rate with vitrification was higher, and that pregnancy potential of cryopreserved oocytes was comparable to that of fresh oocytes. These authors also found that spindle recovery was faster after vitrification than slow freezing. This latter finding has led to the suggestion that intracytoplasmic sperm injection (ICSI) should be performed 3 h after postthaw incubation for slow-freezing oocytes and 2 h later in vitrified/thawed oocytes. Their results are in accordance with our publication [14<sup>\*</sup>], in which we suggested that 3 h after rewarming was the best moment to perform ICSI, when almost all the spindles were repolymerized.

The largest published series comes from Italy. Borini *et al.* [33<sup>\*</sup>] performed a multicenter observational study of slow cooling of oocytes, including 2209 fresh cycles and 940 thawing cycles, and found that slow cooled oocytes achieved a reduced outcome compared with fresh oocytes (77.7% live birth per clinical pregnancy obtained vs.

68.2% in thawed cycles), but showed that slow freezing is a valid method to preserve oocytes.

Another Italian group with experience in vitrification published their results recently. Rienzi *et al.* [34<sup>•</sup>] validated vitrification technique for oocyte cryopreservation in a sibling oocyte study in which a total number of 224 oocytes were randomly allocated to fresh ICSI and subsequent embryo transfer or to vitrification with Cryotop and thawing. No differences were observed between fresh and frozen oocytes in terms of fertilization or embryo development [34<sup>•</sup>], suggesting excellent recovery rates and cellular competence after vitrification and thawing.

Trying to understand the impact of slow freezing on the oocytes, Magli *et al.* [35] compared vitrified and slow frozen sibling oocytes cycles in order to evaluate zygote morphology and embryo development. They found that slow freezing had a negative impact on oocyte potential when compared with vitrification, showing lower fertilization rates (83% vs. 73%,  $P < 0.001$ ) and lower embryo transfer rate per thawing cycle (93% vs. 79%,  $P < 0.001$ ).

Vitrification could be a possibility for patients at risk of ovarian hyperstimulation that need to cancel embryo transfer [15]. Compared with coasting, this is a much safer and more efficient approach if triggering is performed with GnRH $\alpha$  instead of hCG, and it avoids unnecessary embryo banking that may create ethical problems in some couples. Oocytes obtained from high responder patients and subsequently vitrified showed very good survival and pregnancy rates after the vitrification procedure [15].

We may conclude that vitrification induces less cellular damage to the oocyte, results in higher survival rates, and yields excellent outcomes when compared with slow freezing.

---

### Zygote cryopreservation

The most important study concerning zygote cryopreservation was a prospective, clinical cohort study about zygote vitrification after GnRH-agonist triggering for final oocyte maturation in patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) [36]. Zygotes were thawed and transferred in a natural cycle, and authors achieved 77.8% survival rate and 36.8% ongoing pregnancy rate per patient following zygote vitrification, suggesting that this could be a good approach to avoid OHSS.

Zygote cryopreservation has been also used by Shapiro *et al.* [37] as a tool to rescue premature luteinization cycles. They then performed extended culture and

transferred blastocysts. Compared with fresh transfer, the study group achieved a lower blastocyst formation rate, but higher pregnancy (56.8% vs. 32.2%) and implantation rates (56.8% vs. 26.9%).

---

### Slow freezing and vitrification of early cleavage stage embryos and blastocysts

These two different protocols to freeze embryos have been compared with embryos obtained from in-vitro maturation (IVM) cycles. Son *et al.* [38] published a comparison between these two techniques in embryos developed from IVM cycles. From 1999 to 2008, 24 IVM cycles were performed in women with polycystic ovarian syndrome. They vitrified/froze the supernumerary embryos after undergoing fresh embryo transfer. In the thawed-rewarmed cycles, authors found a 61.8% survival rate and no pregnancies in the slow freezing group ( $n = 6$  transfers) and 85.5% survival rate and 25% pregnancy rate in the vitrification group ( $n = 16$  transfers). Even though the numbers are quite small, these results suggest a better outcome after vitrification when embryos are obtained after IVM, where the evidence is limited.

Kuč *et al.* [39] published a retrospective study comparing these two protocols of embryo freezing after conventional IVF-ICSI cycles. Their study showed a higher effectiveness of vitrification when compared with slow cooling (50.4% vs. 25.9% ongoing pregnancy rate,  $P = 0.03$ ). Keskinetepe *et al.* [40] also found better results after Cryotop vitrification. In their retrospective study, in which they compared postthaw survival, pregnancy, and implantation rates of biopsied blastocysts were higher with vitrification (survival rate: 95% vs. 71%, pregnancy rate: 37% vs. 23%,  $P < 0.05$ ).

Kolibianakis *et al.* [41] summarized in a recent review the evidence from randomized controlled trials that compared slow freezing and vitrification of embryos. They concluded that vitrification was not associated with a higher probability of pregnancy than slow freezing in experienced groups, but it did show a higher postthawing survival rate in cleavage and blastocyst stage embryos, which may be a positive outcome as less embryos are lost in the procedure.

Most of the best results obtained after vitrification were obtained with open systems, such as Cryotop. However, different open devices had been utilized with varying results. Hong *et al.* [42] using electron microscopy grids, obtained an implantation rate of 40.6%. Nakashima *et al.* [43] used a novel nylon mesh container as a vitrification device, and achieved 98% survival rate.

Embryo cryopreservation could be also used as an emergency procedure for patients at risk of OHSS, as

suggested previously with oocyte vitrification [15]. Selman *et al.* [44] published their experience in a limited number of patients with very attractive results. Sixty-nine embryos derived from 24 patients at risk of developing OHSS were vitrified and warmed for deferred embryo transfer, resulting in 10 clinical pregnancies.

There is still a controversy about the optimal stage for cryopreserving embryos, as the results may vary according to the experience of the different laboratories. Moragianni *et al.* [45] recently reported the outcome of their freezing program, with statistically similar clinical pregnancy and implantation rates whether they froze zygotes, day 3 embryos or blastocysts.

Creating supernumerary embryos may be a problem for some patients, according to their ethical and/or religious beliefs. In fact, most patients do want their embryo to be replaced in the future. Lyerly *et al.* [46] published a US multiinstitutional survey regarding patients' choice with their spare embryos. They found that 54% of the patients were likely to use their embryos for future reproduction, while only 21% were donated for research. Thus, it is crucial to have a successful freezing program in order to provide optimal care for patients.

The impact of embryo storage duration on survival rates and cycle outcome were evaluated by Riggs *et al.* [47], who analyzed frozen/thawed cycles from 1986 to 2007. They noted that the cryostorage duration did not have an impact on the survival rate or the implantation/pregnancy rates after thawing.

Cryopreservation of embryos for a second time is sometimes necessary. Kumasako *et al.* [48] compared the outcome of embryos that required a second vitrification – for different reasons – after being thawed with the regular vitrification/thawing program. In their study both implantation and pregnancy rates remained comparable whether the embryos underwent vitrification once or twice. These data support the re-vitrification of supernumerary embryos in situations where there are more good quality embryos after thawing than the patient desires to transfer.

---

## Perinatal outcomes

A point of interest is whether vitrification may affect future perinatal outcome, making the follow up of these pregnancies an attractive issue for future studies. Although the evidence is still limited, it does not seem to have any impact as compared with fresh oocytes. Wikland *et al.* [49] found no adverse neonatal outcome after 106 vitrified blastocyst transfers compared with 203 fresh blastocyst transfers and 200 slow frozen early cleavage stage embryos. Wennerholm *et al.* [50] published a systematic review of children born after cryopreservation

of oocytes and embryos from 1984 to 2008. They concluded that obstetric as well as perinatal parameters were similar whether fresh or frozen transfers were undertaken.

---

## Safety

The great majority of vitrification procedures are performed with open devices, where oocytes or embryos contact directly with liquid nitrogen. Thus, it could be speculated that open vitrification systems could have potential risks of cross contamination. One way to avoid this risk is the use of closed vitrification systems [7,9,11,13,14\*,15,19,23,27\*,51]. A second technique to avoid cross contamination would be to use vapor storage systems in which oocytes or embryos do not directly contact the liquid nitrogen. Studies of this method are still ongoing. Our group recently evaluated the feasibility of storing vitrified donor human oocytes in a vapor storage system [51]. Our prospective randomized study compared classical oocyte banking in liquid nitrogen with this new storage device; we were unable to find any differences in survival, fertilization, cleavage, blastocyst formation, pregnancy and implantation rates between these two methods of storage.

Finally, a third technique to avoid cross contamination while using an open vitrification system is to sterilize liquid nitrogen with ultraviolet radiation, as described by Parmegiani *et al.* [52\*]. They found no contamination after radiation, concluding that this method might be used in combination with open carriers.

---

## Conclusion

Vitrification/warming resulted in significantly higher survival, fertilization, embryo cleavage and development, and clinical pregnancy rates when compared with slow-rate freezing/thawing. Pregnancy potential of cryopreserved oocytes is comparable to that of fresh oocytes when they come from young, healthy women. Even considering the new approaches that have been introduced in slow freezing protocols, vitrification seems to have a lower impact on oocyte physiology. A growing number of centers are incorporating vitrification as it is a simple, reproducible, robust, and inexpensive technique to cryopreserve oocytes and/or embryos.

---

## References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (pp. 302–303).

- 1 Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril* 1954; 5:520–529.
- 2 Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305:707–709.

- 3 Cohen J, Simons RF, Edwards RG, *et al.* Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985; 2:59–64.
- 4 Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; 19:884–886.
- 5 Porcu E, Fabbri R, Damiano G, *et al.* Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:33–37.
- 6 Fabbri R, Porcu E, Marsella T, *et al.* Human oocyte cryopreservation: new perspective regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001; 16:411–416.
- 7 Kuleshova L, Gianaroli L, Magli M, *et al.* Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14:3077–3079.
- 8 El-Danasouri I, Selman H. Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos. *Fertil Steril* 2001; 76:400–402.
- 9 Katayama K, Stehlik J, Kuwayama M, *et al.* High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 80:223–224.
- 10 Yoon T, Kim T, Park S, *et al.* Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2003; 79:1323–1326.
- 11 Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:300–308.
- 12 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.
- 13 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.
- 14 Martínez-Burgos M, Herrero L, Megias D, *et al.* Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil Steril* 2011; 95:374–377.
- A basic study evaluating the cellular damage inflicted to the oocytes by either slow freezing or vitrification, looking the spindle configuration and DNA damage by TUNEL.
- 15 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.
- 16 Kim TJ, Lauffer LR, Hong SW. Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women. *Fertil Steril* 2010; 93:467–474.
- 17 Center for Disease Control and Prevention. Assisted reproductive technology success rates: national summary and fertility clinic reports. Atlanta, GA: Center for Disease Control and Prevention; 2001. p. 549.
- 18 Smith G, Silva E, Silva C. Symposium: cryopreservation and assisted human conception. Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online* 2004; 9:171–178.
- 19 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.
- 20 Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003; 9:583–605.
- 21 Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, *et al.* Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology* 2007; 67:64–72.
- 22 Van den Abbeel E, Schneider U, Liu J, *et al.* Osmotic responses and tolerance limits to changes in external osmolalities, and oolemma permeability characteristics of human in vitro matured MII oocytes. *Hum Reprod* 2007; 22:1959–1972.
- 23 Cobo A, Pérez S, De los Santos MJ, *et al.* Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 17:350–359.
- 24 Chen S, Yang Y. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009; 48:15–22.
- 25 Fahy G, MacFarlane D, Angel C, Meryman H. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21:407–726.
- 26 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.
- 27 Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010; 25:2239–2246.
- The first prospective, randomized, controlled trial showing comparable clinical outcome when using fresh vs. vitrified oocytes from young, healthy women.
- 28 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.
- 29 Molinari E, Revelli A, Racca C, *et al.* Slow-freezing-induced changes of birefringent structures in human oocytes are related to responsiveness to ovulation induction. *Reprod Biomed Online* 2010; 20:619–624.
- 30 Bromfield JJ, Coticchio G, Hutt K, *et al.* Meiotic spindle dynamics in human oocytes following slow-cooling cryopreservation. *Hum Reprod* 2009; 24:2114–2123.
- 31 Coticchio G, Bromfield JJ, Sciajano R, *et al.* Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online* 2009; 19 (Suppl 3):29–34.
- 32 Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, *et al.* Evaluation of postthaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril* 2009; 91 (5 Suppl):2087–2094.
- 33 Borini L, Levi Setti PE, Anserini P, *et al.* Multicenter observational study on slow-cooling oocyte cryopreservation: clinical outcome. *Fertil Steril* 2010; 94:1662–1668.
- The largest dataset collecting experience with oocyte slow freezing.
- 34 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.
- A good trial design to confirm the favorable results obtained after oocyte vitrification.
- 35 Magli MC, Lappi M, Ferraretti AP, *et al.* Impact of oocyte cryopreservation on embryo development. *Fertil Steril* 2010; 93:510–516.
- 36 Griesinger G, Berndt H, Schultz L, *et al.* Cumulative live birth rates after GnRH-agonist triggering of final oocyte maturation in patients at risk of OHSS: a prospective, clinical cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 149:190–194.
- 37 Shapira BS, Daneshmand ST, Garner FC, *et al.* Embryo cryopreservation rescues cycles with premature luteinization. *Fertil Steril* 2010; 93:636–641.
- 38 Son WY, Chung JT, Gidoni Y, *et al.* Comparison of survival rate of cleavage stage embryos produced from in vitro maturation cycles after slow freezing and after vitrification. *Fertil Steril* 2009; 92:956–958.
- 39 Kuć P, Kuczynska A, Stankiewicz B, *et al.* Vitrification vs. slow cooling protocol using embryos cryopreserved in the 5th or 6th day after oocyte retrieval and IVF outcomes. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48:848–858.
- 40 Keskinete L, Sher G, Machnicka A, *et al.* Vitrification of human embryos subjected to blastomere biopsy for preimplantation genetic screening produces higher survival and pregnancy rates than slow freezing. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26:629–635.
- 41 Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21:270–274.
- 42 Hong SW, Sepilian V, Chung HM, Kim TJ. Cryopreserved human blastocysts after vitrification result in excellent implantation and clinical pregnancy rates. *Fertil Steril* 2009; 92:2062–2064.
- 43 Nakashima A, Ino N, Kusumi M, *et al.* Optimization of a novel nylon mesh container for human embryo ultrarapid vitrification. *Fertil Steril* 2010; 93:2405–2410.
- 44 Selman H, Brusco GF, Fiorini F, *et al.* Vitrification is a highly efficient method to cryopreserve human embryos in in vitro fertilization patients at high risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2009; 91 (4 Suppl):1611–1613.
- 45 Moragianni VA, Cohen JD, Smith SE, *et al.* Outcomes of day-1, day-3, and blastocyst cryopreserved embryo transfers. *Fertil Steril* 2010; 93:1353–1355.
- 46 Lysterly AD, Steinhilber K, Voils C, *et al.* Fertility patients' views about frozen embryo disposition: results of a multiinstitutional U.S. survey. *Fertil Steril* 2010; 93:499–509.
- 47 Riggs R, Mayer J, Dowling-Lacey D, *et al.* Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11 768 cryopreserved human embryos. *Fertil Steril* 2010; 93:109–115.
- 48 Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, Araki Y. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertil Steril* 2009; 91:383–386.
- 49 Wikland M, Hardarson T, Hillensjö T, *et al.* Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2010; 25:1699–1707.
- 50 Wennerholm UB, Söderström-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.
- 51 Cobo A, Romero JL, Pérez S, *et al.* Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril* 2010; 94:1903–1907.
- 52 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.
- An interesting new way to overcome the hypothetical risks of cross contamination with open vitrification devices.

## **Capítulo 3**

### **CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS: CONGELACIÓN LENTA VS VITRIFICACIÓN**





## A. INDICACIONES DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS

Existen una serie de indicaciones en las que la criopreservación de ovocitos es de gran utilidad para resolver diferentes situaciones clínicas o incidencias que pueden ocurrir durante el ciclo de estimulación. Algunas de estas indicaciones son:

1. La **ausencia de semen** de la pareja, ya sea por patología seminal como en los casos de azoospermia o por falta de espermatozoides móviles en una biopsia de testículo, o por cuestiones circunstanciales como el que la pareja haya tenido que ausentarse el día de la punción ovárica.

2. Otro grupo de pacientes que se pueden beneficiar del almacenaje de sus propios ovocitos son las **bajas respondedoras**, en las que el escaso número de ovocitos recuperados tras la punción ovárica dificulta o merma las posibilidades de éxito. En estas pacientes la acumulación de ovocitos MII provenientes de 2 o 3 ciclos de estimulación, en teoría aumentaría la capacidad de selección embrionaria y por tanto las posibilidades de gestación.

3. En líneas generales todas aquellas pacientes en las que esté **contraindicada la transferencia de embriones** en fresco son candidatas a criopreservación de ovocitos. Entre ellas encontramos las pacientes en riesgo de sufrir el SHO, pacientes que presentan línea endometrial inadecuada o sangrado el día de la punción ovárica, presencia de pólipos, PCO, etc.

4. La criopreservación de ovocitos es hoy por hoy la mejor opción para **preservar la fertilidad** en pacientes en riesgo de presentar fallo ovárico ya sea de forma iatrogénica, generalmente por tratamiento oncológico, o como consecuencia de un proceso patológico que desemboque en un fallo ovárico precoz o simplemente a causa del proceso natural de la pérdida de ovocitos. Hasta hace algunos años la problemática del deseo reproductivo en pacientes oncológicas era casi inexistente, dada la baja supervivencia al cáncer. Sin embargo hoy en día la realidad es bien distinta, ya que las diferentes terapias oncológicas están aumentando la supervivencia

al cáncer, hecho que también ha aumentado la población de adultos jóvenes, que una vez, superada la enfermedad, desean ser madres/padres. No obstante, estas terapias frecuentemente son responsables de fallo gonadal e infertilidad lo que a menudo genera angustia, baja autoestima y una merma considerable de la calidad de vida en estos pacientes (Yap and Davies 2007). El abordaje de este problema es posible gracias a los avances tecnológicos conseguidos a través de la criobiología aplicada a la reproducción asistida

5. Otro grupo de mujeres potencialmente beneficiarias de la criopreservación de ovocitos está conformado por aquellas mujeres sanas que voluntaria o involuntariamente **posponen su maternidad**. Esta opción es cada vez más frecuente, observándose una elevada proporción de mujeres que desean hacerlo a edades reproductivas avanzadas. Sin embargo, para la gran mayoría de ellas, alcanzar la maternidad puede ser una tarea realmente difícil o incluso imposible debido a la disminución de la fertilidad como consecuencia del proceso natural de la pérdida de ovocitos. Este proceso ocurre de manera espontánea desde la vida fetal hasta la menopausia y es consecuencia de la depleción natural de la reserva ovárica. Se estima que la atresia folicular acelerada comienza hacia la mitad de la treintena incrementándose hacia los 37 años (Lobo 2003). Simultáneamente la calidad ovocitaria también se ve disminuida, de ahí que el potencial fértil de la mujer sufra una merma considerable.

## B. DIFICULTADES ASOCIADAS A LA CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS

Mientras que los espermatozoides pueden ser fácilmente obtenidos, congelados, almacenados y utilizados en pequeñas alícuotas, en el caso de los ovocitos las cosas son muy diferentes. De hecho, los bancos de semen y el uso de semen autólogo congelado constituyen una herramienta de gran utilidad, ofreciendo muy buenos resultados desde hace ya muchos años. En contraste, la obtención de gametos femeninos requiere una estimulación y punción ovárica previa, y por otra parte, su almacenaje y uso ha planteado serios problemas biológicos, técnicos e incluso legales en algunos países.

Durante casi 30 años se ha trabajado para conseguir resultados consistentes y que ofrezcan garantías para su aplicación rutinaria. El interés en esta materia ha crecido durante los últimos años, lo que ha contribuido en gran medida al desarrollo de protocolos para la criopreservación de ovocitos.

Si se analiza detenidamente, el que un ovocito pueda sobrevivir al estrés que representa la congelación, es un hecho realmente sorprendente. Puede decirse que durante las diferentes fases del proceso de criopreservación, incluyendo la exposición a los CPA, enfriamiento, almacenaje, descongelación y retorno a las condiciones fisiológicas, la habilidad de prevenir la formación de hielo es la que finalmente va a determinar la viabilidad del ovocito. La cristalización es incompatible con cualquier organismo vivo.

Además de los diferentes inconvenientes de tipo técnico que presentan estos protocolos, existen **factores intrínsecos al ovocito**, que comprometen los resultados de la congelación:

- En primer lugar, está **el gran tamaño de esta célula** (~150µm de diámetro), siendo la más grandes del cuerpo humano y el hecho de que alberga un gran contenido de

agua. En criobiología el tamaño, y en consecuencia la masa, es un factor decisivo. Obviamente esta particularidad implica que los ovocitos tengan un volumen considerablemente grande, lo que conlleva serias implicaciones a la hora de afrontar el delicado proceso de la criopreservación. En estos procesos va implícita la deshidratación masiva e incorporación de CPA, producto del intercambio osmótico a través de la membrana. Por lo tanto, el proceso de movilizar grandes cantidades de volumen, tanto de agua como de crioprotector, es mucho más complejo en el caso de los ovocitos, existiendo además un elevado riesgo de cristalización.

- Otra limitante que presentan los ovocitos es **la forma**. El ovocito es una esfera muy grande, en la que se ve dificultada la distribución uniforme del crioprotector ya que se crea un gradiente desde la periferia hacia el centro y viceversa, lo que ocasiona que el grado de protección no sea el mismo a todos los niveles.
- Por otra parte, en criobiología el **número de células** es un factor a tener en cuenta. Los sistemas multicelulares pueden compensar hasta en un 50% la pérdida celular, mientras que si nos referimos a una sola célula, se trata de “todo o nada”.
- Existe otro factor directamente relacionado con la vulnerabilidad de los ovocitos a la congelación, y es la **presencia del MS** en los ovocitos maduros (MII), que se despolimeriza al disminuir la temperatura, y al que se hace referencia más adelante.

## C. EFECTOS DE LA CRIOPRESEERVACIÓN SOBRE LOS OVOCITOS

La gran sensibilidad de los ovocitos a cualquier proceso de criopreservación se traduce en varios efectos muy específicos, que podemos resumir en tres principales: el efecto de la temperatura en sí, más conocido como “*chilling injury*”, la formación de hielo y la criofractura.

### **El enfriamiento o efecto “*chilling*”**

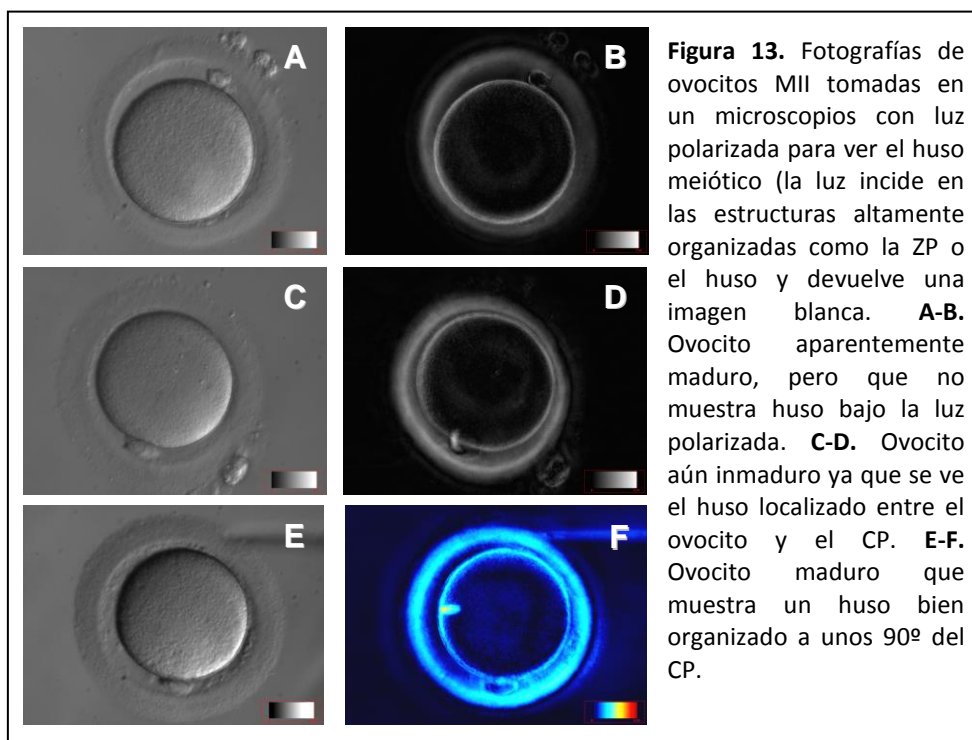
Hace referencia al efecto del frío sobre la célula, ocurre entre +15°C y -5°C y afecta principalmente a los lípidos de membrana, a los microtúbulos del MS y ocasiona el endurecimiento de la ZP (Vajta and Kuwayama 2006). El efecto *chilling* ocurre cuando la membrana de célula se somete a una transición del estado líquido al estado sólido (gel). La composición lipídica de la membrana está íntimamente ligada con sus propiedades y su resistencia a la temperatura. Ghetler y sus colaboradores demostraron que la temperatura durante la congelación lenta ocasiona alteraciones irreversibles en la conformación de los lípidos de la membrana, hecho que está directamente relacionado con la viabilidad tras la descongelación (Ghetler et al. 2005)

Las opciones para contrarrestar este efecto son muy limitadas y casi se reducen a propiciar que los ovocitos pasen por el rango de temperatura comprendido entre +15°C y -5°C a una velocidad extremadamente rápida, lo que se consigue en los procedimientos de vitrificación, siendo justamente lo contrario a lo que ocurre con la congelación lenta, en la que los ovocitos pasan por este rango de temperatura a velocidades extremadamente bajas.

El ovocito MII carece de membrana nuclear que a efectos prácticos se puede considerar como una barrera protectora del material genético. El MS de un ovocito MII contiene los cromosomas alineados en la placa ecuatorial. Esta estructura es muy sensible a los cambios de temperatura, y la despolimerización que ocurre con la exposición al frío, puede ser responsable de una inadecuada segregación cromosómica

al finalizar la meiosis y como consecuencia, originar gametos no balanceados, produciendo así, cigotos aneuploides.

Al contrario de lo que ocurre con los lípidos de membrana, existen diferentes estudios, con protocolos de criopreservación mejorados que evidencian la reversibilidad de este fenómeno (Coticchio et al. 2006, Rienzi et al. 2004). En una publicación de nuestro grupo se presenta que la congelación a través de tres protocolos diferentes de congelación lenta y uno de vitrificación, no altera la capacidad de los ovocitos criopreservados para recuperar la morfología de los husos meióticos, observándose una proporción comparable a la observada en ovocitos frescos (Cobo et al. 2008b). En la **figura 13** podemos ver fotografías de ovocitos tomadas con un microscopio óptico (columna izquierda), y a la derecha, el mismo ovocito observado bajo un haz de luz polarizada.



## **Formación de Hielo**

La formación de hielo, tanto en el medio que rodea las células como en el citoplasma, es una de las mayores fuentes de daño por congelación. Este fenómeno ocurre entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  y presenta un grave efecto mecánico sobre las estructuras celulares (Liebermann et al. 2003). La formación de hielo intracelular ocurre cuando la célula no se ha deshidratado lo suficiente. El efecto nocivo de los cristales de hielo se debe a que ejercen una acción mecánica sobre las membranas celulares afectando su estructura. Este hecho se presenta principalmente durante la recristalización que ocurre con la descongelación, comprometiendo la viabilidad celular. A medida que la célula se deshidrata, se produce un incremento considerable en la concentración de solutos; este fenómeno se conoce como efecto de soluto o de solución (Mazur 1990). Aunque los mecanismos moleculares por los que las sales concentradas dañan las células no se conocen exactamente, se cree que se afectan la estabilidad de la membrana celular, alterando el equilibrio químico de las mismas, lo que trae consigo numerosos cambios biofísicos y bioquímicos que resultan letales para la célula.

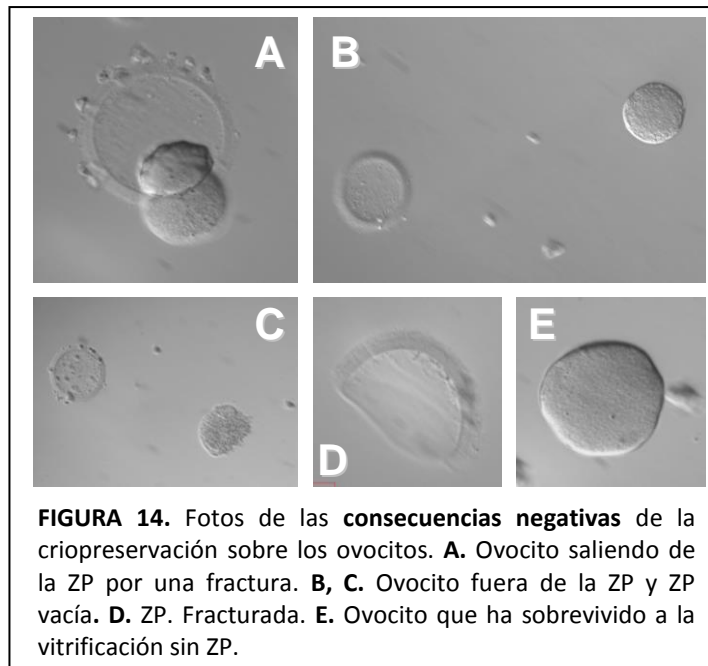
Los protocolos de criopreservación están orientados a minimizar estos efectos a través del control de dos elementos básicos: la utilización de CPA y el control de la temperatura. El empleo de CPA permeables, que difunden al compartimento interno y diluyendo el medio, ayuda a contrarrestar el efecto de las altas concentraciones de solutos e interfiere con la nucleación de hielo en el citoplasma. Por desgracia, el uso de CPA es también otra fuente de efectos nocivos, ya que ninguno de los CPA conocidos es absolutamente inocuo y todos ellos presentan toxicidad tanto química como osmótica.

## **Criofractura**

El efecto mecánico de la solidificación o la ruptura ocasional de la solución puede generar daño por criofractura, especialmente en estructuras biológicas grandes como los

ovocitos o los embriones. Se presenta entre  $-50^{\circ}\text{C}$  y  $-150^{\circ}\text{C}$  y afecta principalmente la ZP (Liebermann et al. 2003).

En la **Figura 14** se muestran fotografías de ovocitos que han sufrido alguno de estos daños.





## D. VENTAJAS DE LA VITRIFICACIÓN

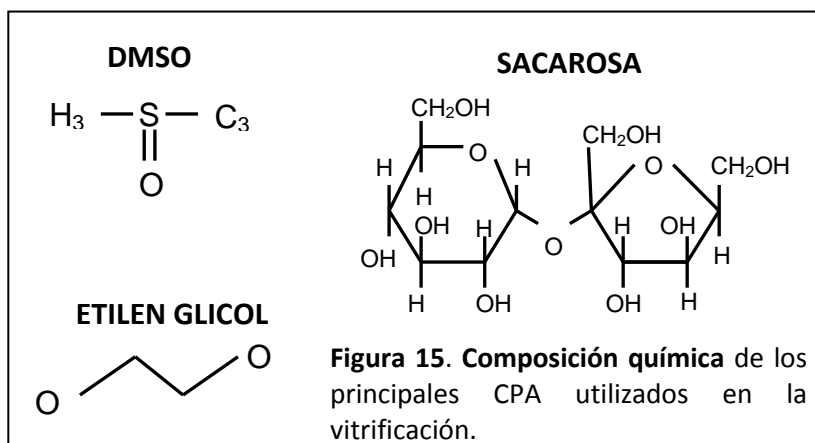
La vitrificación es un técnica de criopreservación de no equilibrio en la que la solidificación ocurre en ausencia de cristales de hielo. Este fenómeno tiene lugar cuando una solución altamente concentrada se somete a bajas temperaturas. Así, la viscosidad de esta solución aumenta de tal manera que cuando se solidifica no cristaliza, sino que se forma una estructura de características físicas similares al vidrio (Rall and Fahy 1985).

Además de la característica secuencia de cambios de volumen en respuesta osmótica que tiene lugar bajo este proceso, existen al menos dos rasgos que los diferencian de otros procedimientos de criopreservación:

- No hay formación de hielo a nivel intra o extracelular, característica muy ventajosa, si tenemos en cuenta que la cristalización no es compatible con la vida.
- Las células se deshidratan osmóticamente antes del enfriamiento mediante el tratamiento con una solución de CPA altamente concentrados, del orden de 6-7 M.

Para que la solución la utilización de CPA altamente concentrados y la aplicación de velocidades de enfriamiento extremadamente altas. La toxicidad de las soluciones de CPA altamente concentrados, puede llegar a ser un inconveniente a la hora de aplicar esta técnica. Debido a ello, el objetivo de los nuevos protocolos es intentar reducir dicha toxicidad.

Para facilitar la deshidratación y así disminuir las posibilidades de formación de hielo intracelular, hace falta el empleo de un crioprotector no permeable. Se han sugerido varias sustancias incluyendo polímeros de baja toxicidad, sin embargo, los azúcares tradicionalmente empleados como sacarosa o trealosa parecen más apropiados (Vajta and Kuwayama 2006). Ver **Figura 15**.



La otra vía para disminuir los efectos osmóticos y tóxicos es la aplicación de velocidades muy altas de enfriamiento. Esto se logra con la inmersión directa en NL y con la utilización de volúmenes muy pequeños de la solución a vitrificar (Kuwayama et al. 2005b). El incremento en la velocidad ofrece la ventaja de reducir el estrés osmótico que causa la alta concentración de crioprotector, además de evitar el paso por el rango de temperatura de +15°C y -5°C, en el que ocurre el “*chilling injury*”. Tras la inmersión directa en NL a -196°C desde 25°C se logran velocidades de vitrificación de 15.000°C/min a 30.000°C/min, utilizando pequeños volúmenes (aproximadamente 1µl) de crioprotector concentrado (Vajta and Kuwayama 2006). Una disminución en el volumen de la muestra, a niveles cercanos al rango de 1µl, utilizando sistemas de soporte de mínima capacidad, aumenta la velocidad de conducción de la temperatura y por tanto se obtienen efectos beneficiosos adicionales. Existe una gran variedad de estos dispositivos en la literatura, como rejillas de microscopía electrónica, pipetas para decumular, bucles de nylon (*cryoloops*), rejillas de nylon, microgotas, pajuelas plásticas estiradas (*open pulled straw-OPS* y *closed pulled straw-CPS*) (Liebermann et al. 2002). Ver **figura 16**.

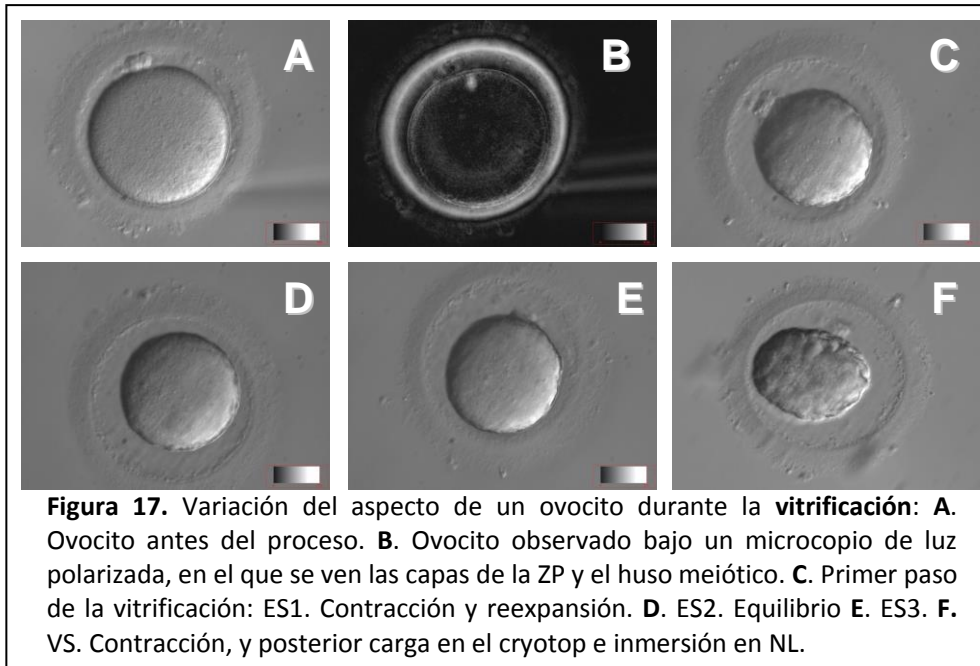


**FIGURA 16.** Diferentes tipos de **soportes para la vitrificación.**  
**ARRIBA: A.** Cryoloop. **B.** Cryoleaf (ambos soportes abiertos en los que los ovocitos están en contacto con el NL). **C.** Cryotip, soporte cerrado, en él la muestra no contacta nunca con el NL.  
**ABAJO:** Cryotop.

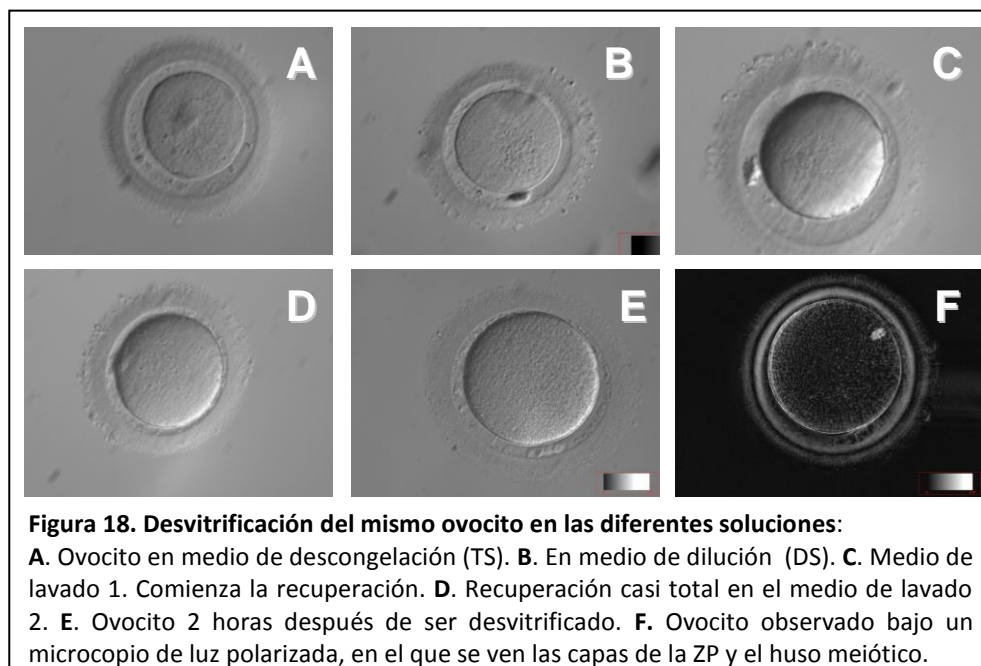
En nuestro laboratorio utilizamos el Cryotop que consiste en una lengüeta de polipropileno, unida a un mango de plástico y que está protegido con pajuela durante la manipulación y almacenaje.

El protocolo de vitrificación con cryotop incluye: un **periodo inicial de equilibrio** (7,5% EG + 7,5% DMSO) en varios pasos permitiendo una recuperación completa del *shock* osmótico inicial. Y la **vitrificación**, que se realiza en una solución que contiene 15% EG + 15% DMSO + 0,5M de sacarosa, la carga se realiza en el Cryotop en un

volumen mínimo antes de su inmersión en NL (velocidad de enfriamiento  $-3000^{\circ}\text{C}$ ). Ver **figura 17**.



Para la **desvitrificación** se debe aplicar una velocidad de calentamiento igualmente elevada con el fin de evitar la formación de cristales de hielo. Para esto las muestras se llevan directamente de la temperatura del NL ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) a  $37^{\circ}\text{C}$ , con lo que se logra una velocidad de  $42.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Para la rehidratación de los ovocitos se utiliza una dilución decreciente de sacarosa en 4 pasos. Ver **Figura 18**.



## **E. EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA MORFOLOGÍA, CONFORMACIÓN DEL HUSO MEIOTICO Y EN EL ADN DEL OVOCITO**

Mónica Martínez, Leyre Herrero, Diego Megías, Rubén Salvanés, Ana C. Cobo,  
Juan Antonio García Velasco.

*Fertility and Sterility* (Factor de impacto 4,265)

Volumen 95, Número 1. Páginas 374-377. Enero de 2011.

Desde el primer embarazo logrado tras la criopreservación de ovocitos en 1986, los protocolos han evolucionado muy deprisa, atendiendo a la necesidad de un protocolo seguro y eficaz, y también debido a las múltiples aplicaciones clínicas de esta técnica, como la preservación de la fertilidad, el riesgo de SHO, etc, que se han explicado previamente. El desarrollo de la técnica de la vitrificación ha resultado en un mínimo daño celular y además excelentes resultados clínicos, por lo que muchos laboratorios de RA la han incorporado como técnica de rutina en su práctica diaria.

Respecto al daño celular inducido por las técnicas de criopreservación, este estudio tiene como objetivo la valoración de éste, tanto en la vitrificación como en la congelación lenta de ovocitos. Para ello se ha realizado la evaluación, antes y después de la aplicación de los protocolos de criopreservación, de las características morfológicas de los ovocito, alteraciones del MS y fragmentación del DNA (mediante la

técnica de TUNEL de Inglés “*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*”).

### **Material y métodos**

Los 149 ovocitos que se analizaron en este estudio fueron donados a la investigación por 10 donantes anónimas, que firmaron los correspondientes consentimientos informados, con las siguientes características fenotípicas:

- Edad media de  $26,2 \pm 2$  años
- IMC de  $23,9 \pm 4,2$  kg/m<sup>2</sup>
- Media de folículos antrales preovulatorios  $12,3 \pm 1,6$
- Media de FSH en día 3 de estimulación  $7,7 \pm 1,5$  mUI/ml

Los 149 complejos cúmulo-ovocito obtenidos tras la punción de las diferentes donantes fueron incubados durante las 2 horas siguientes, y después decumulados. Solo los 124 ovocitos en estadio MII fueron incluidos en el estudio (83.2% de tasa de madurez), y se tomaron fotografías enfocando el CP en el microscopio óptico (Olympus, London, UK) y bajo luz polarizada (Oosight, CRi, MA, USA) en cada paso de cada protocolo aplicado a cada uno de los ovocitos del estudio. De cada ovocito se midió además el grosor de la ZP, el ángulo formado por el MS (si éste estaba presente) y el CP, el volumen de citoplasma y su aspecto.

Los 149 MII obtenidos fueron asignados aleatoriamente a uno de estos 3 grupos de estudio:

- **Grupo control** (21MII)
- **Grupo 1, protocolo congelación lenta** (50 MII). Cada ovocito fue congelado por separado siguiendo el protocolo de congelación lenta de ovocitos de Cook Medical (Bloomington, IN, USA).
- **Grupo 2, protocolo de vitrificación** (53 MII) según el método del Cryotop, (Kitazato, Tokio, Japón), descrito por Kuwayama (Kuwayama et al. 2005b)

Los ovocitos pertenecientes a los grupos de estudio fueron almacenados en NL entre 1 y 3 meses, y después descongelados o desvitrificados siguiendo el protocolo correspondiente, y tomando fotografías en cada paso. Después cada ovocito fue incubado durante 3 horas, y fijado (*In situ Cell Death Detection Kit*, Fluorescein, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) para la posterior comprobación de la fragmentación del ADN mediante la técnica de TUNEL, que consiste en detectar la cascada de señales apoptóticas que causan la fragmentación del ADN etiquetando el extremo de los ácidos nucleicos.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows (Chicago, IL, USA)* aplicando el test de Kolmogorov a cada variable para comprobar su normalidad, y la *t* de *student* o  $\chi^2$  en las comparaciones de medias y porcentajes respectivamente. Los p valores menores de 0,5 se consideraron significativos.

## **Resultados**

En la tabla 1 del artículo se resumen los resultados principales obtenidos del análisis de las imágenes tomadas a cada ovocito. Las diferencias significativas se observaron en la tasa de supervivencia, que fue mayor en el grupo 2 que en el grupo 1 (86,8% vs. 50%; p valor <0,0001) y en la presencia de MS cerca de CP (entre 0 y 30°) tras la criopreservación. El porcentaje de volumen perdido y después recuperado fue similar en ambos grupos, sin embargo la presencia de huso tras la vitrificación fue significativamente mayor que tras la descongelación lenta (93,5% vs. 72%; p valor 0,0128). Se observó también que los ovocitos que no mostraron MS antes de la criopreservación sobrevivieron menos que aquellos en los que sí se vio MS (50% vs. 78,3%; p valor 0,0035).

En el grupo 2 se observó que el CP tiende a cambiar su posición respecto al MS, formando un ángulo mayor que antes de la vitrificación, cosa que no ocurre en el grupo de congelación lenta. Todo esto se puede ver en la **figura 19**, que se resume la tabla 1 del artículo.

No se observó ninguna diferencia notable en el aspecto del citoplasma del ovocito, ni en el grosor de la ZP, ni tampoco se halló fragmentación del ADN de ningún ovocito, ni del grupo control, ni de los grupos de estudio.

**Figura 19:** Resumen de los datos más relevantes de la tabla 1 del artículo, respecto a la supervivencia ovocitaria y las características de MS de los ovocitos estudiados:

	<b>Vitrificación</b>	<b>Congelación lenta</b>	<b>p valor</b>
Tasa de <b>supervivencia</b>	86,8%	50%	<b>&lt;0,0001</b>
Tasa de <b>aparición de MS</b> antes de la criopreservación	67,9%	66%	NS
Tasa de <b>presencia de MS 3h después</b> de la criopreservación	93,5%	72%	<b>0,0128</b>
CP y MS formando un <b>ángulo entre 0 y 30°</b> antes de la criopreservación	88,9%	87,9%	NS
CP y MS formando un <b>ángulo entre 0 y 30° 3 horas</b> tras la criopreservación	32,6%	66,7%	<b>0,0141</b>

## **Discusión**

Tras el análisis de los resultados obtenidos, en general, podemos decir que la vitrificación induce menor daño celular que la congelación lenta sobre los ovocitos. La misma conclusión ha sido publicada por diversos autores, que coinciden con nosotros además en que la vitrificación es más simple y eficaz que la congelación lenta.

Aunque la reducción de volumen medio de los ovocitos observada en ambos grupos de estudio fue similar, la velocidad de recuperación fue mayor en el grupo 2. En este estudio no se observaron diferencias en el aspecto del ovocito, pero hay



publicaciones previas que concluyeron que la criopreservación causa endurecimiento de la ZP, liberación prematura de los gránulos corticales, y alteraciones en el MS.

El hecho de que el ángulo formado entre el CP y el MS aumente tras la vitrificación en el grupo 2, podría ser debido a la rápida contracción del citoplasma. Aunque está descrito que durante el ICSI la probabilidad de dañar el MS es muy baja, nosotros recomendamos, debido a este resultado y siempre que sea posible, la comprobación no invasiva de la presencia y posición del MS antes de la realización del ICSI.

La integridad del ADN no se vio afectada en ninguno de los grupos de estudio, al igual que han observado otros autores, utilizando también el análisis mediante TUNEL. Aunque esperábamos encontrar alguna diferencia en el grado de fragmentación del ADN, como se ha observado en publicaciones previas en ovocitos bovinos, hemos concluido que la fragmentación del DNA no ocurre en este tipo de procedimientos.

Como conclusión podemos decir que la vitrificación permite al ovocito recuperar antes el volumen celular perdido, preserva la estructura del MS y ofrece una tasa de supervivencia mayor que los protocolos de congelación lenta.



# Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage

To assess possible effects on subcellular organization after cryopreservation, we compared vitrified and slowly frozen oocytes in terms of their post-warm/thaw morphology, meiotic spindle configuration, and DNA integrity. DNA integrity of cryopreserved oocytes was not altered after the procedures, but vitrification was more effective than slow cooling, as shown by higher survival rate and spindle assessment despite a higher misalignment between meiotic spindle and polar body. (*Fertil Steril*® 2011;95:374–7. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Vitrification, slow freezing, cellular volume, meiotic spindle, DNA fragmentation

Oocyte cryopreservation is an extremely useful technique that allows patients to cryopreserve their eggs in different clinical settings (fertility preservation, ovarian hyperstimulation risk, ethical reasons, and so on) (1–4). Since Chen (5) described the first pregnancy achieved from frozen oocytes, interest in this technique has grown tremendously. Several freezing protocols have been described with acceptable survival, fertilization, embryo development, and pregnancy rates (6–10). However, the efficiency of the technique has been quite low, with a pregnancy rate per thawed oocyte between 2.3% and 4.2% (11, 12).

Vitrification, a newer technique for egg cryopreservation, combines ultrarapid cooling with minimum volume and high cryoprotectant concentration (13), avoiding crystal formation because water is transformed into a gel without ice formation, which may reduce cellular damage with excellent clinical outcome (13–16).

Mónica Martínez-Burgos, Ph.D.<sup>a</sup>

Leyre Herrero, Ph.D.<sup>a</sup>

Diego Megías, Ph.D.<sup>b</sup>

Rubén Salvanes, B.Sc.<sup>a</sup>

María C. Montoya, Ph.D.<sup>b</sup>

Ana C. Cobo, Ph.D.<sup>c</sup>

Juan A. Garcia-Velasco, M.D., Ph.D.<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> *IVI-Madrid, Madrid, Spain*

<sup>b</sup> *Confocal Microscopy and Cytometry Unit, Biotechnology Programme, National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain*

<sup>c</sup> *IVI-Valencia, Valencia University, Valencia, Spain*

<sup>d</sup> *Rey Juan Carlos University, Madrid, Spain*

Received March 7, 2010; revised July 29, 2010; accepted July 30, 2010; published online September 8, 2010.

M.M.-B. has nothing to disclose. L.H. has nothing to disclose. D.M. has nothing to disclose. R.S. has nothing to disclose. M.C.M. has nothing to disclose. A.C.C. has nothing to disclose. J.A.G.-V. has nothing to disclose.

Reprint requests: Juan A. Garcia-Velasco, M.D., Ph.D., IVI-Madrid, Av del Talgo 68, 28223 Aravaca, Madrid, Spain (FAX: 34-91-180-2910; E-mail: [jgvelasco@ivi.es](mailto:jgvelasco@ivi.es)).

However, comparisons regarding cellular damage induced by slow freezing versus vitrification are lacking. In the present study, we performed this comparison based on evaluation of morphologic changes in the oocytes, meiotic spindle (MS) alterations, and DNA fragmentation after application of each technique.

A total of 149 oocytes were obtained and used for research during follicle aspiration from ten egg donors included in the study (mean age  $26.2 \pm 4.0$  years; body mass index  $23.9 \pm 4.2$  kg/m<sup>2</sup>; day 3 FSH level  $7.7 \pm 1.5$  mIU/mL; antral follicle count  $12.3 \pm 1.6$ ). Each participant provided written informed consent for research purposes, and the project had Institutional Review Board approval from the Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Madrid, Spain.

After oocyte retrieval, the oocyte-cumulus complexes were incubated in standard culture conditions for 2 hours in human tubal fluid medium and denuded. Only metaphase II (MII) oocytes were individually identified and included in this study. Optical microscope and polarized light microscope oocyte images were taken at every step of the protocols. The MII oocytes for each donor were evenly allocated by a technician blinded to the study into three experimental groups, with a 2:2:1 distribution: group 1 (slow freezing; n = 50; 40.3%), group 2 (vitrification; n = 53; 42.7%), and group 3 (fresh control; n = 21; 16.9%). The total number of MII oocytes analyzed was 124.

Fifty oocytes included in group 1 were individually frozen by following a slow-freezing protocol using an Oocyte Cryopreservation Kit (Cook Medical, Bloomington, IN, USA), and 53 oocytes included in group 2 were vitrified by following the Cryotop method described by Kuwayama et al. (13) using Kitazato (Tokyo, Japan) tools and solutions. Oocytes were stored in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) for 1–3 months. After storage, all oocytes from groups 1 and 2 were thawed or warmed.

Each control (not cryopreserved) oocyte (n = 21) and the surviving oocytes from slow freezing (n = 25) and vitrification (n = 46) were cultured in standard conditions for 3 hours and images taken.

**TABLE 1**

**Meiotic spindle presence and angle formed between polar body and meiotic spindle before and after cryopreservation.**

	Vitrification	Slow freezing	P value
Meiotic spindle presence			
Survival rate, % (n)	86.8 (46/53)	50 (25/50)	<.0001
Meiotic spindle before cryopreservation, % (n)	67.9 (36/53)	66.0 (33/50)	.8376
Meiotic spindle 2 h after rewarming, % (n)	87.0 (40/46)	68.0 (17/25)	.0545
Meiotic spindle 3 h after rewarming, % (n)	93.5 (43/46)	72.0 (18/25)	.0128
Mean zona pellucida thickness after cryopreservation, $\mu\text{m}$	24.2 $\pm$ 5.1	24.1 $\pm$ 5.5	.9239
Angle formed between polar body and meiotic spindle, % (n)			
Before cryopreservation			
0–30°	88.9% (32/36)	87.9% (29/33)	.8968
31–60°	2.8% (1/36)	6.1% (2/33)	.5035
61–90°	8.3% (3/36)	6.1% (2/33)	.7248
91–120°	0%	0%	—
>121°	0%	0%	—
3 h after cryopreservation			
0–30°	32.6% (14/43)	66.7% (12/18)	.0141
31–60°	9.3% (4/43)	5.6% (1/18)	.6311
61–90°	34.9% (15/43)	22.2% (4/18)	.3287
91–120°	11.6% (5/43)	0	.1320
>121°	11.6% (5/43)	5.6% (1/18)	.4728

Martínez-Burgos. Correspondence. Fertil Steril 2011.

Oocytes were individually fixed for assessment of DNA fragmentation using the terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) technique (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Cell imaging was performed using a Leica TCS SPX AOBS with a  $\times 63$  Plan Apo 1.32 NA oil immersion objective (Leica, Mannheim, Germany). Leica confocal software was used for acquisition and analysis of images, which were later adjusted for contrast using Adobe Photoshop software.

Oocytes were assessed under a noninvasive polarized light microscope system (Oosight; CRi, MA, USA) attached to an IX71 inverted microscope (Olympus, London, U.K.). Each oocyte was rotated until the polar body (PB) was in focus on the periphery of the oocyte. Oocytes were considered not to carry spindle after three negative rotations.

The following measurements were taken using microscopy software: average zona thicknesses (based on three different measures), spindle-PB angle, and cytoplasmic volume (calculated as an average of the estimated radius from three measures). Cytoplasm appearance, survival, and spindle presence were also assessed.

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences for Windows, version 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) and MedCalc Software (Ghent, Mariakerke, Belgium). We applied the Kolmogorov test to all our variables to assure normality (Lilliefors  $P > .05$ ). *t* tests and  $\chi^2$  tests were performed to compare average values and percentages, and *P* values of  $< .05$  were regarded to be significant.

The vitrification group showed a significantly higher survival rate (86.8%) compared with the slow-cooled oocytes (50%;  $P < .0001$ ) (Table 1).

The volume of vitrified oocytes was reduced up to 52.4%. The same volume loss was observed in slow-freezing oocytes (53.9%

of original volume). The oocytes recovered almost all their initial volume with no significant differences (95.7% in vitrified and 85.7% in slow-cooled oocytes).

Presence of the MS before and after cryopreservation was analyzed (Table 1). Vitrified oocytes showed a significantly higher spindle presence rate 3 hours after cryopreservation compared with slow-cooled oocytes (93.5% vs. 72.0%;  $P = .0128$ ). The presence of MS before cryopreservation was correlated with survival rate (54/69 [78.3%] in oocytes with MS vs. 17/34 [50.0%] in oocytes showing no MS;  $P = .0035$ ).

Almost all vitrified oocytes without MS before cryopreservation (8/10, 80%) repolymerized their spindles 3 hours after cryopreservation and incubation. However, only 43.8% (3/7) of slow-frozen oocytes with no prior MS exhibited it after 3 hours in culture ( $P = .1233$ ).

In vitrified oocytes, the PB tended to change its original place, forming a higher angle between MS and PB (although no correlation was found between volume loss and angulation between PB and MS after vitrification). In the slow-freezing group this change did not happen. Table 1 shows the misalignment between MS and first PB.

Interestingly, no significant changes were observed in cytoplasmic appearance during the process. There were also no changes in zona pellucida (ZP) thickness, with mean ZP thickness before cryopreservation  $24.1 \pm 5.1 \mu\text{m}$  and no differences after cryopreservation (Table 1).

No DNA fragmentation was observed by TUNEL assay in slow-freezing/thawed oocytes ( $n = 25$ ) and vitrified/warmed oocytes ( $n = 46$ ); the control group ( $n = 21$ ) also showed no DNA fragmentation.

With these results comparing cellular damage induced by vitrification versus slow freezing, vitrification seems to have less impact on oocyte cellular health than slow cooling.

As different authors (13, 17–19), including our group (16), have shown, vitrification is simpler and more effective than slow cooling, offering better survival rates. In the present series, we also found significantly higher survival rates after vitrification compared with slow cooling (87% vs. 50%;  $P < .0001$ ). Vitrification minimized the damage associated with traditional slow cooling, such as ice crystal formation, chilling injuries, and osmotic shock (20, 21), which may be responsible for the better outcomes observed.

We observed a similar volume reduction in both vitrified and slow-frozen oocytes (52.4% vs. 53.9%). However, vitrified oocytes tended to recover original volume faster. Whether this recovery rate affects future cell viability is debatable, but it may indicate healthier cytoplasm and membranes. The freeze–thaw process may cause irreversible damage in the oocyte, such as ZP hardening, premature release of cortical granules, depolymerization of the microtubules, and misalignment of the chromosomes (22–25). Compared with cleavage-stage embryos, mature oocyte freezing traditionally yields a lower survival rate (26). Cytoplasmic oocyte membranes have fewer submembranous actin microfilaments (27), reducing their resistance to traditional slow freezing. Therefore, we may speculate that vitrification, which avoids the required dehydration process of traditional slow cooling, induces less damage to cytoplasmic membranes and potential cell viability.

We observed that vitrified oocytes tended to repolymerize their spindles more effectively than slow-cooled oocytes, but they showed higher misalignment between the spindle and the PB. Although total volume changes were similar with both techniques, with vitrification they occurred much faster; as cytoplasm shrinks rapidly, that is likely to displace first PB. This would be a mechanical effect similar to that previously described during decumula-

tion before intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in in vivo mature oocytes (28). Even though chances to damage the MS during microinjection are low (29), because of our findings we recommend to evaluate it with a noninvasive technique during ICSI to confirm not only its presence but also its placement.

We detected the MS in 91.1% of vitrified oocytes, even if they did not express it after denudation. However, MS was present in only 72% of frozen oocytes after a 3-hour post-thaw incubation, which has been suggested as possibly helping to restore MS (8). Although spindle recovery rate may vary among the different cryopreservation protocols used, we have noted that vitrification seems to maintain the spindle apparatus at higher rates, as reported by others (30).

Interestingly, we observed no differences in DNA integrity after vitrification or slow-freezing procedures. In bovine oocytes, temperature modifications may trigger DNA fragmentation and cell degeneration via apoptosis (31). Although we might expect differences in DNA fragmentation according to the diverse effects that freezing procedures have on cellular and molecular functions as well as on cytoplasmic functions (32), we did not detect them. Gualtieri et al. also obtained similar results using TUNEL, suggesting that DNA integrity may not be altered after the procedure (33).

In conclusion, we have shown that after ultrarapid cooling, oocytes tend to recover cellular volume faster, and that the spindle structure is better preserved than when oocytes undergo classic freezing protocols, with no differences in DNA fragmentation. These differences in induced cryodamage may explain the higher survival rates of vitrified oocytes and suggest that vitrification is a promising approach for oocyte storage.

## REFERENCES

- Gook DA, Edgar DH. Cryopreservation of the human female gamete: current and future issues. *Hum Reprod* 1999;14:2938–40.
- Melo-Martin I, Cholist IN. Researching human oocyte cryopreservation: ethical issues. *Fertil Steril* 2008;89:523–8.
- Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer. *N Engl J Med* 2009;360:902–11.
- Shamonki MI, Oktay K. Oocyte and ovarian tissue cryopreservation: indications, techniques and applications. *Semin Reprod Med* 2005;23:266–76.
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1:884–6.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16:411–6.
- Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001;75:354–60.
- Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, Tsai YY, Yang YS. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod* 2005;20:1975–80.
- Chamayou S, Alecci C, Ragolia C, Storaci G, Maglia E, Russo E, et al. Comparison of in-vitro outcomes from cryopreserved oocytes and sibling fresh oocytes. *Reprod Biomed Online* 2006;12:730–6.
- Bianchi V, Cotichio G, Distratis V, Di Giusto N, Flamigni C, Borini A. Differential sucrose concentration during dehydration (0.2 mol/L) and rehydration (0.3 mol/L) increases the implantation rate of frozen human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007;14:64–71.
- Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C, Cotichio G. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2006;21:512–7.
- Boldt J, Tidswell N, Sayers A, Kilani R, Cline D. Human oocyte cryopreservation: five year experience with a sodium-depleted slow freezing method. *Reprod Biomed Online* 2006;13:96–100.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:300–8.
- Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008;89:1657–64.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007;14:72–9.
- Cobo A, Bellver J, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Pellicer A. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. *Reprod Biomed Online* 2008;17:68–72.
- Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12:779–96.
- 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.
- Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. *Theriogenology* 2007;67:73–80.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;247:C125–42.
- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006;65:236–44.
- Nottola SA, Macchiarelli G, Cotichio G, Bianchi S, Ceconi S, de Santis L, et al. Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. *Hum Reprod* 2007;22:1123–33.
- Van Blerkom J, Davis PW. Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc Res Tech* 1994;27:165–93.

24. Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1987;2:207–16.
25. Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Greco E. Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;10:192–8.
26. Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB. Clinical application of human egg cryopreservation. *Hum Reprod* 1998;13:3156–9.
27. Gook DA, Osborn SM, Johnston WI. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993;8:1101–9.
28. Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, et al. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18:1289–93.
29. Woodward B, Montgomery S, Hartshorne G, Campbell K, Kennedy R. Spindle position assessment prior to ICSI does not benefit fertilization or early embryo quality. *Reprod Biomed Online* 2008;16:232–8.
30. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology* 2007;67:64–72.
31. Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology* 2003;47:73–81.
32. Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update* 2007;13:591–605.
33. Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril* 2009;91:1023–34.

## **Capítulo 4**

### **VITRIFICACIÓN EN LA PREVENCIÓN DEL SHO**





## A. EL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA

### Etiología y fisiopatología del SHO

El SHO es una **complicación iatrogénica** derivada de los tratamientos de RA. Los mecanismos fisiológicos y patológicos que hacen que se desencadene el síndrome aun no son del todo conocidos. Para evitar esta complicación que puede llegar a ser grave es importante la identificación de las pacientes de riesgo y la puesta en marcha de medidas de prevención. Entre el 0,1% y el 2% de las pacientes sometidas a EOC desarrollan formas severas del SHO.

Existe el SHO de origen diferente al provocado por una EOC con gonadotropinas, como en situaciones en las que hay un estímulo ovárico endógeno, como puede ocurrir en una mujer gestante con Síndrome de ovario poliquístico (SOP) (Zalel et al. 1992), en pacientes gestantes con altos niveles de hCG (Ludwig et al. 1998, Mancino et al. 1999) o en pacientes con hipotiroidismo primario por los altos niveles de TSH (Rotmensch and Scommegna 1989, Taher et al. 2004). En cualquier caso es necesario el **estímulo de las gonadotropinas** para desencadenar el mecanismo fisiopatológico del SHO.

La actividad de la hCG, similar a la de la LH, ya sea exógena o endógena es lo que dispara el SHO. Sin ese estímulo el SHO no se desarrollará (Mathur et al. 2007). EL inicio del SHO puede ser **Precoz**, si se presenta entre los 3 y 7 días posteriores a la administración de la hCG en la EOC; o **Tardío**, si debuta entre los 12 y 17 días tras la aplicación de la hCG, lo que sucede en pacientes gestantes debido a la hCG endógena producida por el trofoblasto.

Lo fundamental para reducir la incidencia del SHO es la **identificación de las pacientes de riesgo**. Para ello se tiene en cuenta los siguientes rasgos de las pacientes:

- **Edad:** las pacientes jóvenes tiene mayor predisposición (Enskog et al. 1999) debido al número de folículos que suele ser mayor, y a la mayor densidad en el número de receptores de gonadotropinas.
- **SHO en una estimulación previa:** en estos casos hay que ser cautelosos con las dosis de gonadotropinas que se recetan.
- **IMC:** existe una relación clara entre un IMC bajo y la aparición de SHO.
- **Concentración sérica de E<sup>2</sup>,** que se usa como parámetro para monitorizar la respuesta a la EOC, y está relacionado con la incidencia de SHO severo (Mathur et al. 2000).
- **Síndrome de ovario poliquístico (SOP).** Estas pacientes además suelen presentar obesidad, hiperandrogenismo y LH elevada por lo que deben ser vigiladas (Fulghesu et al. 1997)
- **Elevado número de folículos y tamaño** durante la EOC, y en el momento de la administración de la hCG.

### **Síntomas y clasificación**

Los síntomas más comunes de SHO se producen por la extravasación de líquido desde los vasos sanguíneos por el aumento de permeabilidad vascular causado por la hCG. La aparición de los síntomas asociados al SHO se pueden observar desde el final de la EOC, cuando la alta respuesta aumenta el volumen de los ovarios causando incomodidad a la paciente. Pasados 2 días de la administración de la hCG aparecen los primeros síntomas, como náuseas, vómitos y dolor abdominal, que progresaran rápidamente tras la aspiración folicular, siendo ya graves a las 7-10 días. En este tiempo se acumula ascitis y causa distensión abdominal y oliguria, aumento de peso y de perímetro abdominal.

Si la paciente se embaraza tras la transferencia embrionaria, los síntomas empeoran debido a la hCG que secreta el sincitiotrofoblasto.

Actualmente el SHO se clasifica en 4 estados según el nivel de gravedad:

- **SHO Leve:** ovarios ligeramente aumentados de tamaño, y altos niveles de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>.
- **SHO moderado:** Ovarios con un diámetro entre 5 y 12 cm, niveles altos de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>, distensión y dolor abdominal, distensión y dolor abdominal y probables náuseas o vómitos o diarrea.
- **SHO grave:** ovarios con más de 12 cm de diámetro, ascitis, hidrotórax (Calvo-Romero and Lima-Rodriguez 2004) e incluso derrame pericárdico. Se observan también ganancia de peso, inestabilidad hemodinámica, dificultad respiratoria, afectación de la función renal y hemoconcentración.
- **SHO crítico:** en el que la vida de la paciente está amenazada, y se observa un abdomen a tensión, hidrotórax, derrame pleural y hemoconcentración severa.

Las formas leve y moderada se pueden tratar de forma ambulatoria, pero las pacientes con SHO severo o crítico deben ser ingresadas en una unidad de cuidados intensivos. El tromboembolismo es la consecuencia más peligrosa del SHO (Baumann and Diedrich 2000)

### **Prevención del SHO**

Aunque se han propuesto numerosas estrategias de prevención, la más importante es la correcta identificación de las pacientes de riesgo, pero esto no siempre es posible. En el caso de sospechar dicho riesgo una vez empezada la estimulación, al observar por ejemplo un rápido ascenso de los niveles de E<sub>2</sub> o un gran reclutamiento folicular (*Practice Committee of American Society for Reproductive*

*Medicine 2008*) hay varias opciones a tener en cuenta para evitar el desarrollo del SHO:

- **Cancelar el ciclo de estimulación.** Supone suspender la administración de la hCG y cancelar el ciclo, pero es una alternativa 100% segura. Obviamente supone una gran frustración para paciente y médico.
- **Coasting.** Es una alternativa eficaz, que reduce la incidencia de SHO, pero no al 100%. Consiste en suspender la administración de gonadotropinas manteniendo el análogo, y esperar que el E2 descienda. Los folículos pequeños entran así en atresia, disminuyendo la producción de mediadores y la frecuencia de SHO (García-Velasco et al. 2006). Esta medida no es aceptada por todo el mundo, pero ha demostrado ser eficaz y segura, y no alterar los resultados del TRA siempre que su duración sea menor de 4 días (García-Velasco et al. 2004). Según García-Velasco, el *coasting* debe iniciarse cuando los niveles de E2 sean mayores de 4500 pg/ml y/o más un número de folículos maduros (16-18 cm de diámetro) entre 15 y 30. El Coasting se dará por fracasado siempre que se desarrollen más de 30 folículos maduros, el estradiol se eleve por encima de 6500 pg/ml o la medida dure más de 3 días.
- **Inducción de la maduración final de los ovocitos con agonistas de la GnRH.** Se logra así un pico endógeno de LH y se evita la administración de hCG (Gonen et al. 1990). Diversos estudios han confirmado la validez y seguridad de este método de prevención, que es posible llevar a cabo gracias al uso de los protocolos de estimulación con antagonistas de la GnRH. Aunque estudios realizados en donantes de óvulos han demostrado que la calidad de los ovocitos, y la implantación no varían y desaparece el SHO (Acevedo et al. 2006), la mayoría de estudios realizados en pacientes con elevado riesgo de SHO han encontrado un déficit de fase lútea y menores tasas de implantación y embarazo (Griesinger et al. 2006) por lo que la fase lútea debe ser suplementada de alguna forma para evitar que las tasas bajen (Kol and Solt 2008).

- **Antagonistas dopaminérgicos.** Bloqueando uno de los receptores de VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial) se inhibe el aumento de permeabilidad vascular mediado por VEGF, fundamental en el inicio del SHO. Igualmente se ha probado en donantes y pacientes y parece no afectar a la calidad ni a las tasas de implantación y embarazo (Alvarez et al. 2007a, Alvarez et al. 2007b), aunque se ha publicado que no reduce la incidencia si la paciente se embaraza (Busso et al. 2010).
  
- **Vitrificación de ovocitos.** De esta forma se cancela el ciclo de FIV evitándose el SHO secundario, pero se conservan los ovocitos para utilizarlos cuando no haya riesgo para la paciente. Esta medida, unida a una de las dos medidas anteriores según si se ha estimulado con antagonistas o con agonistas de la GnRH, se convierte en la mejor alternativa, ya que previene todas las fases del SHO.



## **B. INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN CON AGONISTAS DE LA GnRH Y VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS COMO ALTERNATIVA AL *COASTING* EN PACIENTES CON RIESGO DE SHO**

Leyre Herrero, Sandra Pareja, Ana Cobo, Antonio Pellicer, Juan Antonio García-Velasco.

*Fertility and Sterility* (Factor de impacto 4,265)

Volumen 95, Número 3. Páginas 1037-1140. Marzo de 2011.

Como se ha explicado en la introducción de este capítulo, hay ciertas pacientes que cuando llevan a cabo una EOC, están en riesgo de sufrir SHO, lo que puede conllevar serias complicaciones. También se han descrito las diferentes estrategias que se pueden llevar a cabo en estos casos. El objetivo de éste estudio es, justamente, comparar dos de estas estrategias. En nuestra clínica, clásicamente, se utilizaba el *coasting* como forma de evitar el SHO, pero la introducción de la vitrificación de ovocitos en nuestro laboratorio nos ha llevado a pensar que la posibilidad de estimular con Antagonistas de la GnRH, inducir la maduración final de los ovocitos con Agonistas, y vitrificar los ovocitos maduros obtenidos tras la punción folicular, podría ser la mejor estrategia en estos casos.

Se organizó entonces un estudio observacional prospectivo, que se llevó a cabo durante todo el año 2009, y que incluyó a 248 pacientes que durante ese periodo mostraron una alta respuesta a la EOC (E2 >4000 pg/ml y/o más de 20 folículos maduros) según los criterios de nuestro grupo (Isaza et al. 2002). Tras informar a los pacientes de las dos posibilidades disponibles, sus ventajas y desventajas, y teniendo en cuenta el consejo de su médico, 96 pacientes decidieron vitrificar sus ovocitos, y 152 llevaron a cabo el *coasting* (Garcia-Velasco et al. 2006).

### **Material y Métodos**

Las 248 pacientes incluidas en el estudio, llevaron a cabo la EOC con un protocolo largo con agonistas de la GnRH (triptorelin, 0,1 mg; Ipsen Pharma, Madrid, Spain) o un protocolo diario de antagonistas (Orgalutran, Schering-Plough, Madrid, Spain; Cetrotide, Merck-Serono, Madrid, Spain), y 225 UI de FSH recombinante (Gonal F, Merck-Serono; Puregon, Schering-Plough) como dosis inicial, seguida de ajustes individualizados, según las características de cada paciente. La inducción de la ovulación se realizó, en el caso del primer protocolo, con hCG (250 mg Ovitrelle; Serono, Madrid, Spain), y en el caso de protocolo de antagonistas, con 0,2 mg de triptorelina. Las punciones ováricas se realizaron 36 horas después. En las pacientes cuyo *coasting* duró más de 4 días, la punción folicular fue cancelada. El protocolo de vitrificación de ovocitos utilizado fue el método del Cryotop. Todas las pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado para ser incluidas en el estudio.

El análisis estadístico se realizó mediante el *SPSS for Windows* (Chicago, IL, USA) aplicando el test de Kolmogorov a cada variable para comprobar su normalidad, y la *t* de *student* o  $\chi^2$  en las comparaciones de medias y porcentajes respectivamente. Los *p* valores menores de 0,5 se consideraron significativos.



## Resultados

En la tabla 1 del artículo se resumen las principales variables comparadas entre grupos (ver **figura 20**). Como se ve en la tabla, la tasa de cancelación de transferencia fue estadísticamente mayor en el grupo del *coasting* (8,3% vs. 19,7%; p valor 0,0151), y el número de MII utilizados por ciclo fue menor en el grupo de vitrificación de ovocitos (10,7 vs. 17,9; p valor <0,0001) debido a que en el ciclo de transferencia no se desvitrificaron todos los ovocitos para evitar la recongelación de embriones sobrantes. Se observó que los resultados generales de los ciclos fueron mejores en el grupo de vitrificación de ovocitos.

**Figura 20.** Resumen de los resultados más relevantes obtenidos tras la transferencia de los embriones en los ciclos llevados a cabo en los grupos de estudio.

	<b>Grupo 1 Vitrificación de ovocitos</b>  (N=96)	<b>Grupo 2 Coasting</b>  (N=152)	<b>p valor</b>
<b>Tasa de cancelación de ciclo</b>	8,3%	19,7%	<b>0,0151</b>
<b>Ovocitos recuperados</b>	20,4±3,2	20,1±0,6	NS
<b>MIJ inyectados</b>	10,7±4	17,9±2,8	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Tasa de fecundación</b>	75,1%	70%	NS
<b>Media de Embriones transferidos</b>	1,9±0,6	1,9±0,6	NS
<b>Tasa de gestación clínica</b>	50%	29,5%	<b>0,0012</b>
<b>Tasa de implantación</b>	32,1%	19,2%	<b>0,0209</b>
<b>Tasa de aborto clínico</b>	9,1%	11,1%	NS

Datos expresados en media±SD o %.

En el grupo del *coasting*, 30 ciclos fueron cancelados (28 de ellos debido al desarrollo de SHO moderado) y se vitrificaron los embriones resultantes. Las transferencias de estos embriones vitrificados dieron lugar a resultados algo más bajos que los observados tras la vitrificación de ovocitos, pero la diferencia no resultó significativa.

## **Discusión**

En general, tras analizar los resultados que obtuvimos, podemos decir que la combinación de un protocolo de antagonistas con un bolo de agonistas para desencadenar la maduración folicular final, seguido de la vitrificación de los ovocitos, es una alternativa segura y eficaz en caso de riesgo de SHO.

La inducción del pico de LH endógeno con agonistas no causó una disminución en el número de ovocitos obtenidos en las punciones, ni en su calidad, ni en las tasas de implantación o embarazo evolutivo, como han observado otros grupos. Un soporte de la fase lútea adecuado es de gran ayuda en estos casos.

El hecho de que en el grupo de vitrificación de ovocitos no se diera ningún caso de SHO, comparado con el 18,4% de las pacientes que sufrieron SHO moderado en el grupo del *coasting*, dice mucho a favor de este protocolo de actuación.

La tasa de supervivencia ovocitaria observada en este estudio fue menor que otras tasas publicadas, probablemente debido a la baja calidad de los ovocitos de las pacientes hiperrespondedoras. Hay autores que afirman que estos ovocitos que no sobreviven a la vitrificación debido a su baja calidad, tampoco darían lugar a embriones con buen potencial implantatorio.

Hay autores que no ven la necesidad de vitrificar ovocitos pudiendo vitrificar embriones con tasas de supervivencia cercanas al 100%. Pero en este tipo de pacientes, la cantidad de embriones generados y congelados puede ser muy alta, y al

vitrificar ovocitos y desvitrificarlos poco a poco, superamos este problema y sus consiguientes connotaciones morales.

Como conclusión podemos afirmar que al vitrificar ovocitos en estos casos, y transferir los embriones resultantes tras la vitrificación de un número razonable de ovocitos en ciclos naturales posteriores a ciclo de hiperrespuesta conseguimos unos resultados más que aceptables. En nuestra opinión, esta estrategia que combina la inducción de la maduración folicular con agonistas de la GnRH y la posterior vitrificación de ovocitos, es una opción atractiva, segura y eficaz en los casos en los que se sospecha un posible riesgo de SHO.



# 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

In this observational trial, we compared the impact on two different strategies, egg vitrification ( $n = 152$ ) obtained after triggering final oocyte maturation with GnRH agonists and transferring the embryos at a later stage, with classical coasting ( $n = 96$ ) to avoid OHSS in patients at risk due to high response to COH. Our results show that oocyte vitrification after GnRH agonists triggering is a highly attractive, safe, and efficient alternative to postpone embryo transfer in patients at high risk of OHSS, resulting in decreased risk for the patient and a better cycle outcome (pregnancy rate 50% vs 29.5%). (*Fertil Steril*® 2011;95:1137–40. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Ovarian hyperstimulation, oocyte vitrification, coasting, HCG

Patients undergoing ovarian stimulation for IVF are at risk for developing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), which is a serious complication (1, 2). Strategies to reduce the risk of OHSS will be closely related to hCG administration (3). Before hCG administration, it is possible to cancel the cycle (4) or initiate coasting (5), which will reduce the population of healthy granulosa cells and, consequently, the amount of vasoactive substances released in response to hCG. A second approach might be to reduce the dose of hCG (6) or to avoid hCG altogether by using GnRH agonists to induce the endogenous LH peak (7). This strategy requires the use of GnRH antagonist to control the cycle; however, with this approach the luteal phase may be compromised (7). A final approach would be to freeze the embryos to avoid the production of trophoblast-dependent hCG that could trigger late-onset OHSS. At this stage, different methods can be used to diminish the symptoms, such as the use of dopamine agonists (8, 9), aromatase inhibitors, or GnRH analogs (10, 11).

Substitution of hCG for a single GnRH agonist bolus is the safest protocol and avoids the frustration of cycle canceling in patients receiving GnRH antagonists. In addition, the excellent results obtained with egg vitrification (12, 13) may allow a combination of these two approaches to avoid both early-onset (exogenous hCG-dependent) and late-onset (endogenous, pregnancy-derived, hCG-dependent) OHSS, while eliminating the need for adequate and specific luteal support.

The aim of our study was to compare the effect on cycle outcome in this high-risk patient population of this combined approach of GnRH agonist bolus to induce final oocyte maturation combined with egg vitrification versus classical coasting.

This study was a retrospective, observational trial. From January 2009 to December 2009, a total of 248 patients undergoing IVF–intracytoplasmic sperm injection (ICSI) showed a high response to controlled ovarian hyperstimulation (serum  $E_2 \geq 4,000$  pg/mL and/or  $\geq 20$  mature follicles) (14). Patients were treated according to their decision, after careful counseling about the benefits and drawbacks of both options with their doctors: 96 patients underwent oocyte vitrification after oocyte pick-up to perform ICSI and ET in a subsequent natural cycle; the remaining 152 patients were coasted following our protocol as previously described (5). Both groups were comparable in terms of body mass index (mean  $\pm$  SD,  $23.8 \pm 1.7$  vs.  $24.1 \pm 1.5$  kg/m<sup>2</sup>) and indications for ICSI (male factor [78% vs. 81%], tubal factor [11% vs. 10%], failed IUI or unexplained [11% vs. 9%]). Informed consent was obtained from all patients before recruitment, and the trial was approved by the institutional ethical committee.

Subjects underwent a long protocol with a GnRH agonist (triprotelin, 0.1 mg; Ipsen Pharma, Madrid, Spain) or daily antagonist protocol (Orgalutran, Schering-Plough, Madrid, Spain; Cetrotide, Merck-Serono, Madrid, Spain), with a maximum of two prior attempts. Ovarian stimulation was performed as described

Leyre Herrero, Ph.D.<sup>a</sup>

Sandra Pareja, Ph.D.<sup>a</sup>

Carolina Losada, Ph.D.<sup>a</sup>

Ana Cristina Cobo, Ph.D.<sup>b</sup>

Antonio Pellicer, M.D., Ph.D.<sup>b</sup>

Juan Antonio Garcia-Velasco, M.D., Ph.D.<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> IVI-Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup> IVI-Valencia, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Rey Juan Carlos University, Madrid, Spain

Received August 3, 2010; revised September 21, 2010; accepted September 22, 2010; published online November 3, 2010.

L.H. has nothing to disclose. S.P. has nothing to disclose. C.L. has nothing to disclose. A.C.C. has nothing to disclose. A.P. has nothing to disclose. J.A.G.-V. has nothing to disclose.

Reprint requests: Juan Antonio Garcia-Velasco, M.D., Ph.D., IVI-Madrid, Av. del Talgo 68, 28023 Madrid, Spain (E-mail: [jgvelasco@ivi.es](mailto:jgvelasco@ivi.es)).

**TABLE 1****IVF cycle outcome in both groups.**

	Vitrified oocytes group	Coasted patients group	P value
n	96	152	
Age (y)	33.4 ± 3.3	33.2 ± 4.1	0.6876
Coasting duration (d)		2.1 ± 0.6	
Transfer cancellation rate (n)	8.3 (8)	19.7 (30)	0.0151
Eggs retrieved (n)	20.4 ± 3.2 (1958)	20.1 ± 3.1 (3058)	0.5055
MII, rewarmed or obtained (n)	10.7 ± 4 (1026)	17.9 ± 2.8 (2730)	<0.0001
Fertilization rate (n)	75.1 (570/857)	70 (1911/2730)	0.5628
Embryos transferred (n)	1.9 ± 0.6 (168)	1.8 ± 0.6 (224)	0.2023
Biochemical pregnancy rate (n)	54.5 (48/88)	35.2 (43/122)	0.0028
Clinical pregnancy rate (n)	50 (44/88)	29.5 (36/122)	0.0012
Implantation rate (sacs/TE)	32.1 (54/168)	19.2 (47/224)	0.0209
Twin pregnancy rate (n)	25 (11/44)	27.8 (10/36)	0.6274
Miscarriage rate (n)	9.1 (4/44)	11.1 (4/36)	0.6311

Note: Data are expressed as mean ± SD or as a percentage when appropriate. TE = transferred embryos.

Herrero. Egg vitrification to avoid OHSS. *Fertil Steril* 2011.

previously (15), with 225 IU of recombinant FSH (Gonal F, Merck-Serono; Puregon, Schering-Plough) as a starting dose, followed by individual dose adjustment as required according to ovarian response, until the two leading follicles were >18 mm in mean diameter. hCG (250 µg Ovitrelle; Serono, Madrid, Spain) was administered to patients in the long protocol and 0.2 mg triptorelin (0.1 mg) was administered to patients receiving the antagonist; ovarian puncture was performed 36 h later.

According to our institutional criteria and the described series, if more than 20 follicles >18 mm, a serum E<sub>2</sub> level >4000 pg/mL, or both were observed, patients were considered to have a high response to ovarian stimulation. Gonadotropin administration was withheld and the GnRH agonist was maintained (i.e., coasting), until daily measurements of serum E<sub>2</sub> levels decreased to <3500 pg/mL. If an abrupt fall was observed in serum E<sub>2</sub> levels (<1000 pg/mL), or if coasting was required for >4 days, egg retrieval was canceled because oocyte quality might have been affected (5, 14). Oocytes were vitrified following the cryotop method described by Kuwayama et al. (12) using Kitazato (Tokyo, Japan) tools and solutions.

Statistical analysis was performed using the SPSS for Windows, version 11.0 (SPSS, Chicago, IL). The Kolmogorov test was applied to all variables ensure a normal distribution ( $P>0.05$ ). Data were expressed as mean ± standard deviation (SD). Student's *t* test and chi-square test were performed to compare average values and percentages, and  $P<0.05$  was regarded as significant.

A total of 1,026 metaphase II (MII) oocytes belonging to 96 patients who vitrified their oocytes were rewarmed during the study period. A total of 857 oocytes survived (83.5%), and 570 were properly fertilized (66.5%). IVF cycle outcome parameters comparing the study group and the coasted group are summarized in Table 1.

Transfer cancellation rate were significantly higher in coasted patients compared with vitrified oocyte group: eight embryo transfers (8.3%) were canceled in the study group because of poor embryo quality, compared with 30 of 152 (19.7%) canceled ETs in the coasted group because of poor embryo quality or risk of OHSS.

In the vitrified oocytes group, the total number of injected MII oocytes were significantly lower compared with the coasted group (10.7 ± 4 vs. 17.9 ± 2.8;  $P<0.0001$ ), as we rewarmed enough oocytes to have a good ET, but tried to avoid an excess of embryos that would need to be refrozen (Table 1).

Biochemical pregnancy rate, clinical pregnancy rate, and implantation rate were higher after vitrified oocyte transfer compared with ET during the hyperresponse cycle (Table 1).

When we compared the results of frozen-thawed embryos after coasting with vitrified-rewarmed oocytes (28 of the 30 cycles canceled in the coasted group were due to moderate OHSS), we found lower pregnancy and implantation rates as well as lower implantation rate, but these differences were not statically significant.

The results of this study show that the combined approach of GnRH agonist bolus to induce final oocyte maturation together with egg vitrification seems to offer a good alternative to coasting, the most common approach to reduce OHSS incidence in high risk patients.

There are three important conclusions that can be derived from this study. First, we confirm the usefulness of triggering with GnRH agonists to avoid OHSS in patients being treated with GnRH antagonist (16–23). Instead of giving hCG, which stimulates and releases vascular mediators involved in OHSS, such as VEGF or VE-Cadherin (3), for the duration of its presence in serum (approximately 7 days), a single subcutaneous bolus of 0.2 mg triptorelin is enough to induce final oocyte maturation. Stimulating an endogenous LH peak liberated by a GnRH agonist bolus is a safe approach, because the duration of the stimulus ranges between 12 and 36 hours (24) and does not influence the number of oocytes obtained, egg quality, implantation, and pregnancy rates.

Second, the main disadvantage of triggering with GnRH agonists is the disappointing success rates obtained after this approach when embryos are transferred in the fresh cycle (23, 25, 26). Because of the short LH peak induced by the GnRH agonist, this protocol is associated with a defective luteal phase. It is likely that patients

treated with GnRH agonist have received insufficient luteal support with P and E<sub>2</sub>. In addition, the GnRH agonist may have a direct effect on the luteinized granulosa cells, initiating the intracellular cascade and driving the cell to apoptosis (27, 28). Thus, luteolysis would be even more profound under this approach. However, new approaches to adequately support the luteal phase with either intensive steroid supplementation, low-dose hCG, or both are showing more favorable pregnancy rates, stimulating the interest in GnRH agonist triggering (21, 29–32).

Third, the combined approach of GnRH agonist triggering with egg vitrification offers a good alternative to solve the aforementioned difficulties. Compared with coasting, in which cycle cancellation is required in 19.7% and moderate OHSS occurs in 18.4% of patients, with this protocol no OHSS was observed: neither early OHSS, as no hCG was administered, nor late onset OHSS, as no ET was performed. The excellent oocyte survival rates obtained after vitrification (12, 13, 33, 34) were again observed in patients at risk for OHSS. Interestingly, there was a trend toward a slightly lower survival rate, which might reflect a lower oocyte quality in these high-response patients.

We could speculate that these oocytes fertilize in fresh cycles, yielding embryos with low implantation potential, which we discarded because they did not survive after vitrification. Finally it could be argued that, because of the advances in embryo cryopreservation, there is no need for egg freezing (10, 35, 36). However, couples are concerned about creating a large number of zygotes or embryos whose fate will have to be decided (37). By freezing the eggs instead, we can avoid the ethical problem of freezing too many embryos and the potential entanglement in case of divorce and separation of the couple (38). Furthermore, the cycle results obtained are better.

Oocyte vitrification after triggering with GnRH agonists is a highly attractive, safe, and efficient alternative to postpone ET in patients at high risk of OHSS. By warming and fertilizing the eggs at a subsequent cycle, we can offer the patient a good cycle outcome under conditions more similar to the physiologic state than can be obtained with a hyperstimulated cycle. Our results confirm that cycle outcome in terms of implantation rate are improved when embryos are not transferred during the high-response cycle.

## REFERENCES

- Asch RH, Li HP, Balmaceda JP, Weckstein LN, Stone SC. Severe ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology: definition of high risk groups. *Hum Reprod* 1991;6:1395–9.
- Aboulghar MA, Mansour RT. Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. *Hum Reprod Update* 2003;9:275–89.
- Villasante A, Pacheco A, Ruiz A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:314–21.
- Forman RG, Frydman R, Egan D, Ross C, Barlow DH. Severe ovarian hyperstimulation syndrome using agonist of gonadotropin-releasing hormone for in vitro fertilization: a European series and a proposal for prevention. *Fertil Steril* 1990;53:502–9.
- Garcia-Velasco JA, Isaza V, Quea G, Pellicer A. Coasting for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: much ado about nothing? *Fertil Steril* 2006;85:547–54.
- Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Tourmaye H, Camus M, Van Steirteghem AC, Devroey P. Triggering final oocyte maturation using different doses of human chorionic gonadotropin: a randomized pilot study in patients with polycystic ovary syndrome treated with gonadotropin-releasing hormone antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 2007;88:1382–8.
- Fausser BC, de Jong D, Olivennes F, Wrambsy H, Tay C, Itskovitz-Eldor J, et al. Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:709–15.
- Alvarez C, Alonso-Muriel E, García G, Crespo J, Bellver J, Simón C, et al. Implantation is apparently unaffected by the dopamine agonist cabergoline when administered to prevent ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing assisted reproduction treatment: a pilot study. *Hum Reprod* 2007;22:3210–4.
- Alvarez C, Martí-Bonmatí L, Novella-Maestre E, Sanz R, Gómez R, Fernández-Sánchez M, et al. Dopamine agonist cabergoline reduces hemoconcentration and ascites in hyperstimulated women undergoing assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2931–7.
- Lainas TG, Sfontouris IA, Zorzovilis IZ, Petsas GK, Lainas GT, Kolibianakis EM. Management of severe early ovarian hyperstimulation syndrome by re-initiation of GnRH antagonist. *Reprod Biomed Online* 2007;15:408–12.
- Giles J, Requena A, Garcia-Velasco JA, Pacheco A, Pellicer J, Pellicer A. GnRH analogue for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: a pilot study. *Fertil Steril* 2009;91:1366–9.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:300–8.
- Cobo A, Bellver J, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Pellicer A, et al. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. *Reprod Biomed Online* 2008;17:68–72.
- Isaza V, Garcia-Velasco JA, Aragonés M, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Oocyte and embryo quality after coasting: the experience from oocyte donation. *Hum Reprod* 2002;17:1777–82.
- Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, Landazabal A, Remohi J, Simón C, et al. Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetorelix). *Hum Reprod* 2001;16:2533–9.
- Itskovitz-Eldor J, Kol S, Mannaerts B. Use of a single bolus of GnRH agonist triptorelin to trigger ovulation after GnRH antagonist Ganirelix treatment in women undergoing ovarian stimulation for assisted reproduction, with special reference to the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: preliminary report: short communication. *Hum Reprod* 2000;15:1965–8.
- Humaidan P, Bredkjaer HE, Bungum L, Bungum M, Grøndahl ML, Westergaard L, et al. GnRH agonist (buserelin) or hCG for ovulation induction in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2005;20:1213–20.
- Kol S, Mughtar M. Recombinant gonadotrophin-based, ovarian hyperstimulation syndrome-free stimulation of the high responder: suggested protocol for further research. *Reprod Biomed Online* 2005;10:575–7.
- Babayof R, Margalioth EJ, Huleihel M, Amash A, Zylber-Haran E, Gal M, et al. Serum inhibin A, VEGF and TNF alpha levels after triggering oocyte maturation with GnRH agonist compared with HCG in women with polycystic ovaries undergoing IVF treatment: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2006;21:1260–5.
- Engmann L, Siano D, Schmidt D, Nulsen J, Maier D, Benadiva C. GnRH agonist to induce oocyte maturation during IVF in patients at high risk of OHSS. *Reprod Biomed Online* 2006;13:639–44.
- Engman L, DiLuigi A, Schmidt D, Nulsen J, Maier D, Benadiva C. The use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist to induce oocyte maturation after cotreatment with GnRH antagonist in high-risk patients undergoing in vitro fertilization prevents the risk of ovarian hyperstimulation syndrome: a prospective randomized controlled study. *Fertil Steril* 2008;89:84–91.
- Orvieto R, Rabinson J, Meltzer S, Homburg R, Anteby E, Zohav E. GnRH agonist versus GnRH antagonist in ovarian stimulation: is the emperor naked? *Clin Exp Obstet Gynecol* 2006;33:197–9.
- Griesinger G, Diedrich K, Devroey P, Kolibianakis EM. GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2006;2:159–68.
- Díaz I, Guillén A, Pacheco A, Requena A, Garcia-Velasco JA. Endocrine modifications associated with final oocyte maturation with gonadotropin-releasing

- hormone agonists vs. human chorionic gonadotropin in women undergoing intrauterine insemination. *J Reprod Med* 2008;53:33–9.
25. Kol S, Solt I. GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: still a controversy? *J Assist Reprod Genet* 2008;25:63–6.
26. Kolibianakis EM, Schultze-Mosgau A, Schroer A, van Steirteghem A, Devroey P, Diedrich K, et al. A lower ongoing pregnancy rate can be expected when GnRH agonist is used for triggering final oocyte maturation instead of HCG in patients undergoing IVF with GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2005;20:2887–92.
27. Yano T, Yano N, Matsumi H, Morita Y, Tsutsumi O, Schally AV, et al. Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs on the rat ovarian follicle development. *Horm Res* 1997;48:35–41.
28. Takekida S, Deguchi J, Samoto T, Matsuo H, Maruo T. Comparative analysis of the effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on the proliferative activity, apoptosis, and steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells at varying stages of follicular growth. *Endocrine* 2000;12:61–7.
29. DiLuigi AJ, Engmann L, Schmidt DW, Maier DB, Nulsen JC, Benadiva CA. Gonadotropin-releasing hormone agonist to induce final oocyte maturation prevents the development of ovarian hyperstimulation syndrome in high-risk patients and leads to improved clinical outcomes compared with coasting. *Fertil Steril* 2010;94:1111–4.
30. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Ross R. Comparison of human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone agonist for final oocyte maturation in oocyte donor cycles. *Fertil Steril* 2007;88:237–9.
31. Humaidan P. Luteal phase rescue in high-risk OHSS patients by GnRHa triggering in combination with low-dose HCG: a pilot study. *Reprod Biomed Online* 2009;18:630–4.
32. Castillo JC, Dolz M, Bienvenido E, Abad L, Casañ E, Bonilla-Musoles F. Cycles triggered with GnRH agonist: exploring low-dose HCG for luteal support. *Reprod Biomed Online* 2010;20:175–81.
33. Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer, Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2007;89:1657–64.
34. 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.
35. Queenan JT. Embryo freezing to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2000;27:79–83.
36. Griesinger G, von Otte S, Schroer A, Ludwig AK, Diedrich K, Al-Hasani S, et al. Elective cryopreservation of all pronuclear oocytes after GnRH agonist triggering of final oocyte maturation in patients at risk of developing OHSS: a prospective, observational proof-of-concept study. *Hum Reprod* 2007;22:1348–52.
37. Nachtigall RD, Dougall KM, Lee M, Harrington J, Becker G. What do patients want? Expectations and perceptions of IVF clinic information and support regarding frozen embryo disposition. *Fertil Steril* 2010 [Epub ahead of print].
38. Heng BC. Oocyte cryopreservation as an alternative to embryo cryopreservation—some pertinent ethical concerns. *Reprod Biomed Online* 2007;14:402–3.



## **Capítulo 5**

### **VITRIFICACIÓN Y TRANSFERENCIA EMBRIONARIA DIFERIDA**



## COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS TRAS LA DESVITRIFICACION DE OVOCITOS Y EMBRIONES EN CICLOS DE FIV CON TRANSFERENCIA EMBRIONARIA DIFERIDA

Leyre Herrero, Sandra Pareja, Marina Aragonés, Ana Cobo, Fernando Bronet, Juan Antonio García-Velasco.

*Reproductive Biomedicine Online* (Factor de Impacto 2,682)

Publicado *on line* el 6 de Agosto de 2014.

(<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.016>)

La actual disponibilidad de la vitrificación en los laboratorios de RA ha tenido como consecuencia la mejora de los resultados derivados de los programas de criopreservación, llegando a alcanzarse tasas de implantación y gestación similares a las obtenidas con ovocitos y embriones en fresco.

Tras la publicación del artículo que se presenta en el capítulo anterior, el objetivo de este estudio fue comprobar si la importante ventaja que encontramos en vitrificar ovocitos a las pacientes en riesgo de desarrollar SHO, eliminando la preservación de un gran número de embriones debido a su alta respuesta a la EOC, estaba disminuyendo los resultados clínicos que podrían tener estas pacientes si en lugar de ovocitos se vitrificaran los embriones resultantes de los ciclos de FIV. Para ello

se ideó este estudio prospectivo y observacional en el que se comparan los resultados obtenidos tras la vitrificación de ovocitos, y los obtenidos tras la vitrificación de embriones en estas pacientes.

### **Material y Métodos**

La población de estudio la formaron 96 pacientes que entre enero de 2011 y junio de 2012 mostraron una alta respuesta a la EOC, de acuerdo con los criterios de nuestro centro, anteriormente descritos. Estas pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado, y fueron asignadas prospectivamente a uno de estos dos grupos de estudio:

**Grupo 1:** Punción folicular y **vitrificación de los ovocitos maduros**, y posterior desvitrificación, ICSI y transferencia embrionaria en un ciclo natural posterior

**Grupo 2:** Punción folicular, FIV o ICSI según la indicación de la paciente, y **vitrificación de los embriones** de buena calidad resultantes. Posteriormente, desvitrificación y realización de las transferencias embrionarias.

La EOC de las pacientes incluidas en el estudio se realizó siguiendo un protocolo largo con antagonistas de la GnRH, 225 UI de FSH recombinante como dosis inicial, y un bolo de agonista de la GnRH para desencadenar la maduración, como ya se ha descrito en el capítulo anterior. Igualmente las punciones foliculares se realizaron 36 horas después de la administración del agonista.

La preparación del endometrio para la transferencia de los embriones se realizó con Valerato de estradiol (Progynova; Schering-Plough, Madrid, Spain), como describe Soares en su artículo del 2008 y progesterona micronizada vía vaginal, 800 mg/día (Progeffik; Effik Laboratories, Madrid, Spain) (Soares et al. 2008)

La vitrificación de ovocitos y embriones se llevó a cabo con el método del cryotop descrito anteriormente. Los ovocitos desvitrificados se incubaron en

condiciones estándar, y se inyectaron 3 horas después. Los embriones se valoran inmediatamente después de la desvitrificación, y se incuban hasta el momento de la transferencia. Cuando fue necesario se valoraron una segunda vez, por ejemplo en el caso de los blastocistos, para verificar su expansión.

Las transferencias embrionarias en este estudio, y en los previos, se realizaron con cánulas Cook (K-Soft, J-SPPE; Cook Ob/Gyn, Spencer, IN, USA) y bajo control ecográfico. En el grupo 1, aquellos embriones de buena calidad que se obtuvieron tras la desvitrificación de todos los MII, fueron revitrificados siguiendo el mismo protocolo.

El análisis estadístico se realizó mediante el *SPSS for Windows* (Chicago, IL, USA) aplicando el test de Kolmogorov a cada variable para comprobar su normalidad, y la *t* de *student* o  $\chi^2$  en las comparaciones de medias y porcentajes respectivamente. Los *p* valores menores de 0,5 se consideraron significativos.

## **Resultados**

Las 96 pacientes que formaron parte del estudio tuvieron al menos un MII tras la punción folicular, y al menos un embrión para transferir, es decir, no hubo ninguna transferencia embrionaria que se cancelara. No se observó ningún caso de SHO. Las características previas a la punción folicular de las pacientes en ambos grupos fueron comparables y se resumen en la tabla 1 del artículo. Sin embargo, se obtuvo un número significativamente menor de cigotos y embriones útiles en el grupo 1 (**Figura 21**), mientras que el resto de resultados de los ciclos fueron comparables. La supervivencia ovocitaria fue del 78,8%, y la supervivencia embrionaria del 89,4%.

Algunas de las pacientes que no resultaron embarazadas tras la primera transferencia, y tenían más embriones vitrificados llevaron a cabo un segundo y algunas hasta un tercer intento. Los resultados derivados de estas transferencias se resumen en la **figura 21**.

**Figura 21:** Resumen de las características y los resultados obtenidos tras la desvitrificación en ambos grupos de estudio:

	<b>Ovocitos vitrificados (N=50)</b>	<b>Embriones vitrificados (N=46)</b>	<b>p valor</b>
<b>Media de edad</b>	34,6±3,9	35,9±3,2	NS
<b>E2 prepunción</b>	3517±2153	3648±2198	NS
<b>Ovocitos recuperados</b>	24,9±9,4	23,8±9,3	NS
<b>Media de MII inyectados</b>	19,7±7,7	20,2±9,1	NS
<b>Media de MII fecundados</b>	10,7±5,7	14,8±8,4	<b>0,003</b>
<b>Media de embriones útiles</b>	4,3±2,7	6,4±4,2	<b>0,005</b>

Datos expresados en media±SD.

No se observan diferencias en los resultados obtenidos tras la primera transferencia, pero cuando se analizan los resultados acumulados obtenidos tras todas las transferencias realizadas en cada grupo (74 en el grupo 1 y 68 en el grupo 2) encontramos una tasa de aborto clínico estadísticamente mayor en el grupo 2, como se ve en la tabla de la **figura 22**.

**Figura 22:** Resumen de los datos acumulados en los grupos de estudio:

	<b>Ovocitos vitrificados (N=50)</b>	<b>Embriones vitrificados (N=46)</b>	<b>p valor</b>
<b>Transferencias realizadas por paciente</b>	1,4±0,7	1,5±0,6	NS
<b>Media de embriones transferidos</b>	1,8±0,5	1,7±0,4	NS
<b>Tasa Gestación Clínica</b>	62%	69,6%	NS
<b>Tasa Aborto</b>	9,7%	21,9%	<b>0,04</b>
<b>Tasa de nacido/estimulación</b>	72%	69,9%	NS
<b>Tasa de nacido/embrión transferido</b>	26,9%	27,1%	NS

Datos expresados en media±SD o %.

No hubo diferencia en cuando a la media de embriones transferidos, en el día de desarrollo embrionario en que se realizaron las transferencias, ni en las tasas de niño nacido vivo observadas por estimulación.

## **Discusión**

Los resultados observados tras el análisis de los datos de este estudio muestran que la tasa de “niño en casa” es la misma vitrifiquemos ovocitos o embriones en pacientes que cancelan su transferencia en fresco por riesgo de SHO.

Después de las publicaciones de los últimos años, la vitrificación de ovocitos ya no se considera una técnica experimental (*Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology 2013*) ya que ha dado lugar a más nacimientos que ninguna otra técnica de criopreservación de ovocitos, y ha llevado a una mejora sustancial de la práctica clínica diaria (García-Velasco et al. 2013). Se ha comprobado además que las tasas de supervivencia son muy altas, que no se dan alteraciones metabólicas, ni se induce fragmentación del ADN ovocitaria cuando se aplica este protocolo. Respecto a la vitrificación de embriones, las últimas publicaciones describen una tasa de supervivencia cercana al 95%, resultado que no se había logrado con la congelación lenta, sobre todo en estadio de blastocisto.

En este trabajo la tasa de supervivencia de los ovocitos vitrificados es menor que otras tasas publicadas (78,8%) aunque coincide con las tasa de supervivencia que se observó en el estudio previo. Esto puede ser debido, como se ha explicado antes, a la mala calidad ovocitaria que tiene las pacientes que responden tanto a la EOC. Esta baja tasa de supervivencia lleva a tener un número significativamente menor de MII a inyectar, y por lo tanto el grupo de vitrificación de ovocitos tiene menor media de cigotos y de embriones útiles (embriones de buena calidad, que fueron transferidos o congelados). Aunque las tasas de fecundación y desarrollo embrionario son similares, tenemos que tener en cuenta el hecho de que en el grupo de vitrificación de

embriones tiene 2 embriones más almacenados de media. Este dato es importante a la hora de aconsejar a los pacientes.

Otro resultado difícil de explicar es la diferencia en la tasa de aborto entre los grupos de estudio (9,7% vs. 21,9%; p valor 0,04). Si presuponemos que la vitrificación actúa como un filtro que elimina los ovocitos de mala calidad que en cualquier caso no darían lugar a embarazos viables, esa podría ser una posible explicación para esta dato, ya que la tasa de aborto en el grupo en que no se vitrifican los ovocitos, sino los embriones, es menor.

Aunque la tasa de gestación evolutiva y de recién nacido es comparable entre grupos, nuestro objetivo era encontrar el mejor protocolo de actuación para esta situación de riesgo de SHO en la práctica clínica diaria. Desde un punto de vista ético tiene sentido elegir la vitrificación de ovocitos, que elimina la creación de un gran número de embriones que quedan almacenados. Esta opción sin duda sería la mejor para madres solteras, parejas con problemas de salud o dificultades familiares, o simplemente parejas que desean tener un solo hijo, o con objeciones morales a la criopreservación de embriones. Sin embargo, la opción de vitrificar embriones sería la elegida para aquellas parejas que pretenden maximizar sus posibilidades y tener más de un embarazo.

El mayor sesgo de este estudio es que la asignación de los pacientes a los grupos no es randomizada, ya que nos resultaría difícil de explicar la asignación a un grupo u otro sin tener en cuenta la historia previa de la paciente.

Aun así, podemos concluir que ambas opciones dan lugar a resultados comparables en cuanto a probabilidad de recién nacido vivo. Y por supuesto, este trabajo valida la vitrificación como técnica segura y eficaz de criopreservación para un laboratorio de FIV.





ELSEVIER

www.sciencedirect.com  
www.rbmonline.com



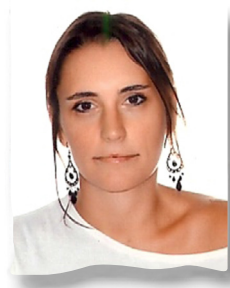
## ARTICLE

# Oocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study


Leyre Herrero Grassa <sup>a</sup>, Sandra Pareja Marín <sup>a</sup>, Marina Aragonés Barragán <sup>a</sup>, Ana Cobo <sup>b</sup>, Fernando Bronet Campos <sup>a</sup>, Juan Antonio Garcia-Velasco <sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> IVI Madrid, Madrid, Spain; <sup>b</sup> IVI Valencia, Valencia, Spain; <sup>c</sup> Rey Juan Carlos University, Madrid, Spain

\* Corresponding author. E-mail address: [Juan.Garcia.Velasco@ivi.es](mailto:Juan.Garcia.Velasco@ivi.es) (JA Garcia-Velasco).



Dr. Leyre Herrero graduated in 2004 from Universidad Autónoma de Madrid School of Biological Sciences. She then studied clinical genetics in Alcalá de Henares University in 2008. She has worked in IVI Madrid since 2005 as senior embryologist in the IVF laboratory. Her main interests are ovarian hyperstimulation syndrome, cryopreservation and embryo development.

**Abstract** The aim of this observational prospective study was to compare multiple embryological and pregnancy outcomes for vitrified oocytes against the same outcomes using vitrified embryos in patients at risk for ovarian hyperstimulation syndrome. Ninety-six patients were included and allocated to vitrification of oocytes (Group 1) or embryos (Group 2). No statistical differences in baseline characteristics between groups were detected. Implantation rate was 30.6% versus 33.1%, and clinical pregnancy rate was 41.9% versus 7.1% in groups 1 and 2, respectively. A higher clinical spontaneous abortion rate occurred in group 2 (9.7% versus 21.9% for groups 1 and 2, respectively), but the same cumulative clinical pregnancy rate was observed after three embryo transfers (62.0% in group 1 and 69.6% in group 2). The ongoing pregnancy rate per patient was similar in both groups (56.0% and 54.3% in groups 1 and 2, respectively). Also, live birth rate per stimulation was similar (72.0% and 69.6% in groups 1 and 2, respectively). No differences were observed in outcomes according to vitrification timing. Oocyte vitrification achieved the same live birth rate as embryo vitrification. 

© 2014 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**KEYWORDS:** embryo, ICSI, oocyte, ovarian hyperstimulation syndrome, pregnancy, vitrification

## Introduction

With the availability and reproducibility of vitrification in the IVF laboratory, oocytes and embryos can be consistently cryopreserved and warmed to yield pregnancy outcomes

similar to those achieved after the use of fresh oocytes and embryos (Cobo et al., 2010, 2012a, 2012b; Herrero et al., 2011a; Mukaida and Oka, 2012; Rienzi et al., 2010).

Vitrification combines ultra-rapid cryopreservation, minimum volume and a high concentration of cryoprotectants

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.016>

1472-6483/© 2014 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

(Kuwayama et al., 2005). It has dramatically increased the efficiency and security of many cryopreservation programmes (Balaban et al., 2008; Kuwayama, 2007; Martinez-Burgos et al., 2011). To date, however, little is known about the optimal vitrification time needed for embryo development, so the question about vitrification of oocytes or embryos remains open.

In the present study, an important advantage of vitrifying oocytes instead of vitrifying embryos was identified. It is known that high-response patients are at risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), and also, as a result of their high oocyte yield, may generate too many embryos for cryopreservation. Circumventing the problem of generating more cryopreserved embryos than the patient may ever use would be attractive to patients and desirable to many IVF units. Nonetheless, the aim of the study was to assess whether the results of cryopreserved embryo transfers were better than those achieved after the use of vitrified oocytes. Therefore, the aim of the present investigation was to prospectively compare two methods: IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with vitrification of embryos directly, or continued vitrification of oocytes in patients at high risk of OHSS.

## Materials and methods

### Study population

A total of 96 patients at risk of OHSS were included in the study between January 2011 and June 2012. According to our institutional criteria (Isaza et al., 2002), if 4000 pg/mL or more serum oestradiol, 20 or more mature follicles (over 14 mm), or both, were observed, the patient was considered to have a high response to ovarian stimulation. Patients were prospectively assigned to group 1 (oocyte vitrification plus rewarming of the oocytes and embryo transfer in a later cycle) or group 2 (ICSI and embryo vitrification, plus cryopreserved embryo transfer in a later cycle) according to their clinical record number (even numbers were assigned prospectively to group 1 and odd numbers were assigned to group 2). Patients were informed by the clinicians about the aim of the study, and asked to voluntarily participate; all study participants provided informed consent, and Institutional Review Board approval from our institution was obtained before starting the study (November 15, 2010; MAD-LH-11-2010-01).

### Ovarian stimulation

Participants underwent a daily antagonist protocol (Orgalutran; Schering-Plough, Madrid, Spain; Cetrotide; Merck-Serono, Madrid, Spain). Ovarian stimulation was carried out as described previously (Garcia-Velasco et al., 2001), with 225 IU of recombinant FSH (Gonal F, Madrid, Spain; Puregon, MSD, Madrid, Spain) as a starting dose, followed by individual dose adjustment as required according to the patient's ovarian response. As soon as two leading follicles were 18 mm or wider in mean diameter, triptorelin (0.2 mg Decapeptyl; IpsenPharma, Madrid, Spain) was administered and ovum retrieval carried out 36 h later.

### Endometrial preparation for cryopreserved embryo transfer

The protocol for endometrial preparation has been described elsewhere (Soares et al., 2008). After menses, all participants received oral oestradiol valerate (Progynova; Schering-Plough, Madrid, Spain), starting with a daily dose of 2 mg that increased to 6 mg; about 10–15 days after starting oestradiol valerate, serum oestradiol levels and endometrial thickness were determined. Vaginal administration of micronized progesterone 800 mg/day (Progeffik; Effik Laboratories, Madrid, Spain) was started 3–5 days before the transfer of vitrified embryos, depending on embryo stage at cryopreservation.

The embryos were warmed and then evaluated, embryos with more than 50% of cells intact were considered viable. The embryos were incubated for at least 3 h before embryo transfer. In the case of blastocyst warming, a second check was made 2 h after warming to evaluate the appropriate re-expansion of trophoectoderm before embryo transfers.

### Vitrification and warming

All materials required for vitrification were obtained from Kitazato (Tokyo, Japan). The cryotop method was used for oocyte vitrification as described by Kuwayama et al. (2005), with minimal modifications. Oocytes were equilibrated in three steps at room temperature for 15 min, and then placed in vitrification solution. After 1 min in this solution, oocytes were placed on the cryotop strip, and immediately submerged in liquid nitrogen. No more than four oocytes per cryotop were loaded. For warming, the cryotop was removed from the liquid nitrogen and instantly placed in various diluent solutions for 10 min at room temperature.

The vitrification protocol for embryos and blastocysts was the same as that described for oocytes, except that equilibration was performed in one step for 12–15 min. Oocytes were incubated in fertilization medium for 2 h before ICSI.

In the oocyte vitrification cases, all cryopreserved metaphase II (MII) oocytes were warmed immediately, and if more embryos than those selected for transfer developed correctly, they were re-vitrified. In the cryopreserved embryo transfers, only the number of embryos that had been intended for transfer were re-warmed, beginning with the best quality embryos. During the study period, no patient underwent more than three embryo transfers.

### Embryo transfer

Embryo transfer was carried out with a Cook catheter (K-soft, J-SPPE; Cook Ob/Gyn, Spencer, IN, USA) using a standard technique under ultrasound guidance. In the case of warmed embryos, they were incubated for at least 3 h between warming and embryo transfer. In group 1, all viable embryos not transferred were vitrified.

The clinic's definition of a good-quality day 3 embryo is between seven and nine cells with no more than 15% fragmentation index. A blastocyst is defined as when the inner

cell mass is tightly packed, has several grouped cells and the trophectoderm has many cells forming a cohesive epithelium.

## Outcomes

Reported outcomes of the cryopreserved embryo transfers are as follows: implantation rate (defined as the number of gestational sacs observed divided by the number of transferred embryos); biochemical pregnancy (defined as a positive beta HCG test 10–12 days after embryo transfer); clinical pregnancy (diagnosed by observation of at least one gestational sac and fetal heartbeat on ultrasound); clinical spontaneous abortion (defined as the spontaneous loss of a clinical pregnancy before 12 weeks gestation); ongoing pregnancy (defined as pregnancy that continued for at least 12 weeks after embryo transfer); and live birth (reported as the number of live born babies).

## Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using Statistical Package for Social Sciences version 17 (SPSS, Chicago, IL, USA). The Kolmogorov test was applied to all variables to assure normality (Lilliefors  $P > 0.05$ ). Chi-squared tests and Student's  $t$ -tests were carried out to detect statistical differences in proportions or means between groups, respectively.  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

During the study period, 96 patients at risk of developing OHSS were included, and every patient had at least one MII oocyte or one embryo for cryopreservation or transfer. No embryo transfers were cancelled during the study.

No statistical differences were found in the participants' baseline characteristics. For IVF outcome, mean number of MII oocytes obtained in each group was as follows:  $19.7 \pm 7.7$  in group 1 and  $20.2 \pm 9.1$  in group 2, with a mature rate of 78.8% in group 1 and 84.7% in group 2 (Table 1). A higher mean number of fertilized oocytes and useful embryos (transferred embryos plus cryopreserved embryos) in the embryo vitrification group were observed. No differences were found in fertilization rate (68.7% in group 1 versus 73.3% in group 2) or useful embryo rate (27.9% in group 1 versus 31.3% in group 2) between the groups. No case of OHSS case was encountered in this study (Table 1).

Embryo survival rate was 87.5% in group 1 (42 transferred embryos from 48 warmed embryos) and 89.4% in group 2 (118 transferred embryos from 132 warmed embryos). Oocyte survival rate in group 1 was 78.8% (777 MII surviving and injected out of 986 MII oocytes retrieved).

In group 1, supernumerary good-quality embryos remaining after the first embryo transfer were vitrified again, and subsequent cryopreserved embryo transfers were carried out in 22 cases (16 patients underwent a second embryo transfer, and eight patients underwent a third cryopreserved embryo transfer). In group 2, 19 patients out of the 46 underwent a second cryopreserved embryo transfer, and three

**Table 1** Baseline population characteristics and IVF outcome in compared groups.

	Oocyte vitrification (n = 50)	Embryo vitrification (n = 46)	P-value
Mean age (years)	34.6 ± 3.9	35.9 ± 3.2	NS
Body mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	21.9 ± 2.2	22.5 ± 3.6	NS
FSH level on day 3 (mIU/ml)	5.7 ± 1.6	6.1 ± 2.4	NS
Oestradiol level stimulation day 3 (pg/ml)	83.1 ± 102.4	117.9 ± 201.8	NS
Number of previous stimulations	1.6 ± 1.4	1.8 ± 2.3	NS
Stimulation duration (days)	10.4 ± 1.5	10.2 ± 1.3	NS
Oestradiol level on triggering day (pg/ml)	3517.0 ± 2153.0	3648.0 ± 2198.0	NS
Progesterone level on triggering day (ng/ml)	0.9 ± 0.6	1.0 ± 0.8	NS
Antral follicle count	20.1 ± 9.4	20.5 ± 8.6	NS
Oocytes retrieved n (%)	24.9 ± 9.4 (1245)	23.8 ± 9.3 (1099)	NS
Metaphase II oocytes warmed n (%)	21.2 ± 8.2 (986)	-	
Metaphase II oocytes injected n (%)	19.7 ± 7.7 (777)	20.2 ± 9.1 (931)	NS
Fertilized eggs n (%)	10.7 ± 5.7 (534)	14.8 ± 8.4 (682)	0.003
Useful embryos n (%)	4.3 ± 2.7 (217)	6.4 ± 4.2 (291)	0.005
Fertilization rate n (%)	68.7 (534/777)	73.3 (682/931)	NS
Useful embryo rate n (%)	27.9 (217/777)	31.3 (291/931)	NS

Useful embryo rate: transferred embryos plus cryopreserved embryos (group 2)/metaphase II oocytes injected (group 1).

The dash means that no oocytes were warmed in this group, as here we froze embryos and not oocytes.

NS = not statistically significant.

**Table 2** Outcome per oocyte vitrification cycle and per embryo vitrification cycle.

Group 1	First transfer (oocyte warming)	Second transfer (first cryopreserved embryo transfer)	Third transfer (second cryopreserved embryo transfer)	Total embryo transfers
N	50	16	8	74
Biochemical pregnancy rate	26 (52.0)	6 (37.5)	4 (50.0)	36 (48.6)
Clinical pregnancy rate	22 (44.0)	5 (31.3)	4 (50.0)	31 (41.9)
Twin pregnancy rate	8 (36.4)	1 (20.0)	1 (25.0)	10 (32.2)
Clinical miscarriage rate	1 (4.5) <sup>a</sup>	0	2 (50.0)	3 (9.7) <sup>b</sup>
Implantation rate	30/92 (32.6)	6/28 (21.4)	5/14 (35.7)	41/134 (30.6)

Group 2	First cryopreserved embryo transfer	Second cryopreserved embryo transfer	Third cryopreserved embryo transfer	Total embryo transfers
N	46	19	3	68
Biochemical pregnancy rate <i>n</i> (%)	24 (52.2)	7 (36.8)	2 (66.7)	33 (48.5)
Clinical pregnancy rate <i>n</i> (%)	23 (50.0)	7 (36.8)	2 (66.7)	32 (47.1)
Twin pregnancy rate <i>n</i> (%)	5 (21.7)	2 (28.6)	0	7 (21.9)
Clinical spontaneous abortion rate <i>n</i> (%)	7 (30.4) <sup>a</sup>	0	0	7 (21.9) <sup>b</sup>
Implantation rate <i>n</i> (%)	28/80 (35.0)	9/33 (27.3)	2/5 (40.0)	39/118 (33.1)

<sup>a</sup>*P* = 0.0007 (group 1).<sup>b</sup>*P* = 0.04 (group 2).

underwent a third attempt. The results achieved are presented in **Table 2**.

When cycle outcome per first embryo transfer in each group was compared (**Table 2**, first column), no differences in the number of biochemical pregnancies (52.0% in group 1 and 52.2% in group 2), clinical pregnancies (44.0% in group 1 and 50.0% in Group 2), or implantation rate (32.6% in group 1 versus 35.0% in group 2) were detected. A statistically higher spontaneous abortion rate, however, was found in group 2 (4.5% in group 1 versus 30.4% in group 2; *P* = 0.0007).

Analysis of outcome per total number of embryo transfers (74 transfers in group 1, 68 transfers in group 2) revealed comparable clinical pregnancy and implantation rates (clinical pregnancy: 41.9% versus 47.1%, implantation rates 30.6% versus 33.1%, respectively for groups 1 and 2) but a

higher clinical spontaneous abortion rate in group 2 (9.7% in group 1 versus 21.9% in group 2; *P* = 0.04). When outcome per patient was evaluated, both groups yielded the same cumulative pregnancy rates and ongoing pregnancy rates (**Table 3**).

No differences were observed in live birth rates per stimulation (72.0% and 69.6% in groups 1 and 2, respectively) or per transferred embryo (26.9% and 27.1% in groups 1 and 2, respectively) (**Table 3**).

The mean number of embryos transferred was  $1.8 \pm 0.5$  and  $1.7 \pm 0.4$  (group 1 and 2). Forty three out of 74 (58.1%) transfers of cleavage stage embryos took place in group 1 and 41 out of 68 (60.3%) took place in group 2. Blastocyst stage transfers were carried out in 31 cases (41.9%) in group 1 and in 27 cases (39.7%) in group 2. No statistical differences were found between these rates.

**Table 3** Comparison between cumulative rates in study groups after three embryo transfers (outcome per patient).

	Oocyte vitrification ( <i>n</i> = 50)	Embryo vitrification ( <i>n</i> = 46)
Number of embryo transfers	74	68
Number of embryo transfers per patient (mean $\pm$ SD)	1.4 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.6
Embryos transferred (mean $\pm$ SD)	1.8 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.4
Biochemical pregnancy rate <i>n</i> (%)	36/50 (72.0)	33/46 (71.7)
Clinical pregnancy rate <i>n</i> (%)	31/50 (62.0)	32/46 (69.6)
Twin pregnancy rate <i>n</i> (%)	10/31 (32.3)	7/32 (21.9)
Clinical spontaneous abortion rate <sup>a</sup> <i>n</i> (%)	3/31 (9.7)	7/32 (21.9)
Ongoing pregnancy rate <i>n</i> (%)	28/50 (56.0)	25/46 (54.3)
Live birth rate (baby/stimulation) <i>n</i> (%)	36/50 (72.0)	32/46 (69.6)
Live birth rate (baby/transferred embryo) <i>n</i> (%)	36/134 (26.9)	32/118 (27.1)
Ovarian hyperstimulation syndrome cases	0	0

<sup>a</sup>*P* = 0.04 for group 1 versus group 2.

## Discussion

The data obtained in the present study indicated no differences in live birth rate between vitrified oocytes and vitrified embryos in women undergoing IVF and at risk of developing OHSS. Vitrification protocols applied to human-assisted reproduction technologies were reviewed in 2012 by [Mukaida and Oka \(2012\)](#). They confirmed that vitrification is a reliable and simple strategy that leads to a high survival rate and better clinical outcomes than slow freezing. Oocyte vitrification and warming is no longer considered experimental by the American Society for Reproductive Medicine, as they, and the Society for Assisted Reproductive Technologies, have described similar results for chromosomal abnormalities, birth defects and developmental deficits in fresh and vitrified oocytes ([Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology, 2013](#)). Oocyte vitrification protocols have led to improvements in our clinical practices, including oocyte donation and fertility preservation ([Cobo et al., 2010](#); [Garcia-Velasco et al., 2013](#)).

In our group, exceptional results have been observed after oocyte vitrification in patients at risk of OHSS ([Herrero et al., 2011b](#)). Since the introduction of vitrification into our IVF cryopreservation programmes, 3150 warming cycles have led to a 95.0% embryo survival rate, a 35.5% implantation rate and a live birth rate of 38.1% per warming cycle ([Cobo et al., 2012a](#)).

Last year, a metabolomic profiling study of egg donors ([Dominguez et al., 2013](#)) confirmed that oocyte vitrification does not disturb the metabolomic profile of day 3 embryos, based on a multivariate analysis of global metabolomics and amino acid profiles. Oocytes maintained good ultrastructural preservation before vitrification (e.g. organelles, zona pellucida, cortical granules, and oolema integrity), as revealed by [Khalili et al. \(2012\)](#). [Cobo et al. \(2001\)](#) reported no increase in the rate of chromosomal abnormalities after oocyte freezing, and [Martinez-Burgos et al. \(2011\)](#) observed no DNA fragmentation in cryopreserved oocytes, so it is assumed that cryopreservation itself does not affect oocyte quality or developmental potential.

In the present investigation, the oocyte survival rate was slightly lower (78.8%; 777 surviving oocytes out of 986 MII cryopreserved oocytes) than reported survival rates in egg donors ([Cobo et al., 2010](#)), possibly caused by the lower oocyte quality observed in these high-responder patients. This poor survival rate led to fewer mean MII oocytes microinjected in group 1 participants and significantly fewer fertilized eggs ( $10.7 \pm 5.7$  versus  $14.8 \pm 8.4$ ) and useful embryos ( $4.3 \pm 2.7$  versus  $6.4 \pm 4.2$ ) ([Table 1](#)). Despite the survival rate, fertilization rates were similar in both groups: 68.7% in group 1 and 73.3% in group 2 as were useful embryo rates (27.9% in group 1 versus 31.3% in group 2 as is expected).

The higher, but not significantly, MII oocyte rate in group 2 (79.2% versus 84.7%), in addition to the fact that the survival rate is lower in warmed oocytes than in warmed embryos, could explain the higher average number of useful embryos in group 2. It could be difficult, however, to understand that group 1 can achieve the same results as group 2 with fewer embryos. The fact that group 2 has a higher number of vitrified embryos to transfer, precisely two more vitrified embryos per patient, needs to be taken into account (number of

vitrified embryos left after three transfers: group 1: 77 ( $1.5 \pm 0.6$  per patient); group 2: 159,  $3.4 \pm 1.7$  embryos per patient). Therefore, it is possible to achieve the same outcome by using either oocyte vitrification or embryo vitrification; with embryo vitrification, however, the patients will have more stored embryos.

A difficult to explain result observed in this study is the higher spontaneous abortion rate in the first cryopreserved embryo transfer of group 2. It may be possible that some transferred embryos were already damaged by vitrification; however, the percentage of damaged embryos would have been the same in both groups, considering that the post-warming evaluation was done absolutely equal. The difference in clinical spontaneous abortion rates was statistically significant (9.7% versus 21.9%;  $P = 0.04$ ), so it is possible that vitrification acts as an oocyte quality screening in group 1, and so the oocytes that did not survive because of its poor quality, appeared in fact in group 2 and could be the cause of the higher spontaneous abortion rate.

Although the ongoing pregnancy rate and live birth rate in the present investigation was similar in both study groups after three embryo transfers, the aim was to identify the protocol better suited to routine use in our clinic. From an ethical point of view, our data lead us to choose oocyte vitrification as the better option for patients at risk of OHSS; in our opinion (as in our country and culture), it is preferable to avoid the creation of many excess embryos avoiding legal and ethical complications often related to embryo cryopreservation. Embryo vitrification led to  $6.4 \pm 4.2$  useful embryos per patient, with a range of 1 to 16 vitrified embryos. It could be that embryos created from warmed oocytes were better than warmed embryos; however, in the latter case, patients had two more vitrified embryos. Little is known about the implantation rate of these embryos, and we do not know their potential. Oocyte vitrification allows a number of oocytes to be warmed sufficiently for achieving a good embryo transfer (taking into account the patient's age, semen quality, and embryo quality in previous cycles, limiting the number of couples with higher numbers of cryopreserved embryos than they will never use or need. Therefore, after warming all vitrified oocytes, patients have the same likelihood of becoming pregnant as after warming embryos. They also have the option of avoiding the creation of too many embryos for storage. As embryos developed from previously vitrified oocytes have a similar capacity of undergoing an additional vitrification process and developing into healthy pregnancies ([Cobo et al., 2013](#)), limiting the number of vitrified embryos may prove to be a more flexible option for patients who have practical or ethical reasons for limiting embryo number. Couples who desire only one child, single women, couples experiencing marital distress, divorce or couples in whom one partner has chronic illness may be better served by limiting the number of cryopreserved embryos. Couples who seek to maximize their family size, however, would prefer cryopreservation of embryos rather than oocytes.

The main bias in the present study is that it was not blinded and truly randomized, as this is a difficult concept for patients to accept; however, allocation of patients to one of the two groups based on the individual's clinic record number was respected and, even though design was not ideal, it demonstrated similar results.

In conclusion, in the present study, oocyte vitrification yielded comparable results to those observed after embryo vitrification in take home baby rate. Vitrification has been incorporated into IVF laboratories because it is simple, safe, cheap, and reliable for cryopreserving oocytes, embryos, and blastocysts.

## References

- Balaban, B., Urman, B., Ata, B., Isiklar, A., Larman, M.G., Hamilton, R., Gardner, D.K., 2008. 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.* 23, 1976–1982.
- Cobo, A., Rubio, C., Gerli, S., Ruiz, A., Pellicer, A., Remohi, J., 2001. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil. Steril.* 75, 354–360.
- Cobo, A., Meseguer, M., Remohi, J., Pellicer, A., 2010. Use of cryobanked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum. Reprod.* 25, 2239–2246.
- Cobo, A., de los Santos, M.J., Castello, D., Gamiz, P., Campos, P., Remohi, J., 2012a. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil. Steril.* 98, 1138–1146.
- Cobo, A., Garrido, N., Crespo, J., Jose, R., Pellicer, A., 2012b. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod. Biomed. Online* 24, 424–432.
- Cobo, A., Garcia-Velasco, J.A., Domingo, J., Remohi, J., Pellicer, A., 2013. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and cancer patients? *Fertil. Steril.* 99, 1485–1495.
- Dominguez, F., Castello, D., Remohi, J., Simon, C., Cobo, A., 2013. Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. *Fertil. Steril.* 99, 565–572.
- Garcia-Velasco, J.A., Isaza, V., Vidal, C., Landazabal, A., Remohi, J., Simon, C., Pellicer, A., 2001. Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetrotrelax). *Hum. Reprod.* 16, 2533–2539.
- Garcia-Velasco, J.A., Domingo, J., Cobo, A., Martinez, M., Carmona, L., Pellicer, A., 2013. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil. Steril.* 99, 1994–1999.
- Herrero, L., Martinez, M., Garcia-Velasco, J.A., 2011a. Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 23, 245–250.
- Herrero, L., Pareja, S., Losada, C., Cobo, A.C., Pellicer, A., Garcia-Velasco, J.A., 2011b. 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.* 95, 1137–1140.
- Isaza, V., Garcia-Velasco, J.A., Aragonés, M., Remohi, J., Simon, C., Pellicer, A., 2002. Oocyte and embryo quality after coasting: the experience from oocyte donation. *Hum. Reprod.* 17, 1777–1782.
- Khalili, M.A., Maione, M., Palmerini, M.G., Bianchi, S., Macchiarelli, G., Nottola, S.A., 2012. Ultrastructure of human mature oocytes after vitrification. *Eur. J. Histochem.* 56, 236–246.
- Kuwayama, M., 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 67, 73–80.
- Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, S.P., 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 11, 300–308.
- Martinez-Burgos, M., Herrero, L., Megias, D., Salvanes, R., Montoya, M.C., Cobo, A.C., Garcia-Velasco, J.A., 2011. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil. Steril.* 95, 374–377.
- Mukaida, T., Oka, C., 2012. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 26, 789–803.
- Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology, 2013. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil. Steril.* 99, 37–43.
- Rienzi, L., Romano, S., Albricci, L., Maggiulli, R., Capalbo, A., Baroni, E., Colamaria, S., Sapienza, F., Ubaldi, F., 2010. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum. Reprod.* 25, 66–73.
- Soares, S.R., Velasco, J.A., Fernandez, M., Bosch, E., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C., 2008. Clinical factors affecting endometrial receptiveness in oocyte donation cycles. *Fertil. Steril.* 89, 491–501.

Received 9 March 2014; refereed 9 July 2014; accepted 9 July 2014.

## **Capítulo 6**

### **CONCLUSIONES**





Las conclusiones que se derivan de la presente tesis son las siguientes:

1. La vitrificación se describe como un **método de criopreservación fácil y eficiente**, y cuenta con un gran número de publicaciones que lo apoyan como el primer método elegido actualmente por los laboratorios de FIV a la hora de criopreservar ovocitos, embriones y blastocistos.
2. La vitrificación **permite la criopreservación de ovocitos**, obteniéndose altas tasas de supervivencia tras la desvitrificación y resultados similares a los obtenidos con ovocitos en fresco.
3. La vitrificación de ovocitos, comparada con la congelación lenta, **tiene mayor tasa de supervivencia**, causa menor daño celular y no produce fragmentación en el ADN ovocitario.
4. Cuando nos hallamos ante un caso de riesgo de SHO, la vitrificación de ovocitos ofrece **mejores resultados que la estrategia del Coasting**.
5. En las pacientes con riesgo de SHO una estrategia de prevención a seguir es la estimulación con antagonistas de la GnRH y la **inducción de la maduración con agonistas de la GnRH**. Esto combinado con la vitrificación de ovocitos o embriones es una **opción 100% segura**, y que presenta muy buenos resultados clínicos.
6. La **vitrificación de ovocitos o embriones** en pacientes con riesgo de SHO es una elección que dependerá de cada caso, según la historia previa de la paciente y la valoración de sus necesidades por parte del especialista, siendo ambas buenas opciones en cuanto a su tasa de recién nacido vivo.



## **Capítulo 7**

### **BIBLIOGRAFÍA**



- Acevedo B, Gomez-Palomares JL, Ricciarelli E and Hernandez ER. Triggering ovulation with gonadotropin-releasing hormone agonists does not compromise embryo implantation rates. *Fertil Steril* 2006;**86**:1682-1687.
- Alvarez C, Alonso-Muriel I, Garcia G, Crespo J, Bellver J, Simon C and Pellicer A. Implantation is apparently unaffected by the dopamine agonist Cabergoline when administered to prevent ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing assisted reproduction treatment: a pilot study. *Hum Reprod* 2007a;**22**:3210-3214.
- Alvarez C, Marti-Bonmati L, Novella-Maestre E, Sanz R, Gomez R, Fernandez-Sanchez M, Simon C and Pellicer A. Dopamine agonist cabergoline reduces hemoconcentration and ascites in hyperstimulated women undergoing assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 2007b;**92**:2931-2937.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C and Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:72-79.
- Ascheim S and Zondek B. Insulated prolan B from the uterine of pregnant women. *Klin Wschr* 1928;**7**:8-9.
- Balaban B and Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006;**12**:608-615.
- Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S and Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;**13**:3431-3433.
- Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA and Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996;**11**:2217-2222.

- Baumann P and Diedrich K. Thromboembolic complications associated with reproductive endocrinologic procedures. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;**14**:431-443.
- Bunge RG and Sherman JK. Frozen human semen. *Fertil Steril* 1954;**5**:193-194.
- Bunge RG and Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 1953;**172**:767-768.
- Busso C, Fernandez-Sanchez M, Garcia-Velasco JA, Landeras J, Ballesteros A, Munoz E, Gonzalez S, Simon C, Arce JC and Pellicer A. The non-ergot derived dopamine agonist quinagolide in prevention of early ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 2010;**25**:995-1004.
- Buster JE, Bustillo M, Thorneycroft IH, Simon JA, Boyers SP, Marshall JR, Louw JA, Seed RW and Seed RG. Non-surgical transfer of in vivo fertilised donated ova to five infertile women: report of two pregnancies. *Lancet* 1983;**2**:223-224.
- Calvo-Romero JM and Lima-Rodriguez EM. Bilateral pleural effusion and ascites in the ovarian hyperstimulation syndrome. *Eur J Emerg Med* 2004;**11**:348-350.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA and Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996;**380**:64-66.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951;**168**:697-698.
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;**1**:884-886.
- Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A and Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008a;**89**:1657-1664.

- Cobo A, Perez S, De los Santos MJ, Zulategui J, Domingo J and Remohi J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008b;**17**:350-359.
- Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB and Fishel SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985;**2**:59-64.
- Colonna R, Tatone C, Malgaroli A, Eusebi F and Mangia F. Effects of protein kinase C stimulation and free Ca<sup>2+</sup> rise in mammalian egg activation. *Gamete Res* 1989;**24**:171-183.
- Coticchio G, De Santis L, Rossi G, Borini A, Albertini D, Scaravelli G, Alecci C, Bianchi V, Nottola S and Cecconi S. Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation. *Hum Reprod* 2006;**21**:1771-1776.
- De Villeneuve A. Le tresor des pauvres qui parle des maladies qui peuvent venir au corps humain. Trepperel and Jehannot. Paris 1512. De Graaf R. De Mullerian Organism. Lyon, 1672.
- Ebner T, Moser M and Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI?. *Reprod Biomed Online* 2006;**12**:507-512.
- Edwards RG, Donahue RP, Baramki TA and Jones HW, Jr. Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1966;**96**:192-200.
- Enskog A, Henriksson M, Unander M, Nilsson L and Brannstrom M. Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999;**71**:808-814.

- Eppig JJ. The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. *J Reprod Fertil Suppl* 1998;**38**:3-8
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001;**122**:829-838.
- Eppig JJ. Further reflections on culture systems for the growth of oocytes in vitro. *Hum Reprod* 1994;**9**:974-976.
- Eppig JJ, Wigglesworth K and Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:2890-2894.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S and Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;**16**:411-416.
- Fulghesu AM, Villa P, Pavone V, Guido M, Apa R, Caruso A, Lanzone A, Rossodivita A and Mancuso S. The impact of insulin secretion on the ovarian response to exogenous gonadotropins in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**:644-648.
- Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martinez M, Carmona L and Pellicer A. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril* 2013;**99**:1994-1999.
- Garcia-Velasco JA, Isaza V, Quea G and Pellicer A. Coasting for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: much ado about nothing?. *Fertil Steril* 2006;**85**:547-554.
- Garcia-Velasco JA, Zuniga A, Pacheco A, Gomez R, Simon C, Remohi J and Pellicer A. Coasting acts through downregulation of VEGF gene expression and protein secretion. *Hum Reprod* 2004;**19**:1530-1538.



- Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R and Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod* 2005;**20**:3385-3389.
- Gonen Y, Balakier H, Powell W and Casper RF. Use of gonadotropin-releasing hormone agonist to trigger follicular maturation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;**71**:918-922.
- Gosden RG and Faddy MJ. Biological bases of premature ovarian failure. *Reprod Fertil Dev* 1998;**10**:73-78.
- Griesinger G, Diedrich K, Devroey P and Kolibianakis EM. GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:159-168.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K and Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;**344**:768-770.
- Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM and Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992;**327**:905-909.
- Hanson FM and Rock J. Artificial insemination with husband's sperm. *Fertil Steril* 1951;**2**:162-174.
- Hard AD. Artificial impregnation. *Med World* 1909;**27**:163-164.
- Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc R Soc* 1981;**48**:457-458.
- Hipócrates. Tratados hipocráticos IV. Sobre las enfermedades de las mujeres. Ed. Gredos, 1988. Madrid

- Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ *et al.* Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004;**303**:1669-1674.
- Isaza V, Garcia-Velasco JA, Aragonés M, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Oocyte and embryo quality after coasting: the experience from oocyte donation. *Hum Reprod* 2002;**17**:1777-1782.
- Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O and Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;**80**:223-224.
- Kol S and Solt I. GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: still a controversy?. *J Assist Reprod Genet* 2008;**25**:63-66.
- Krisher RL and Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 1998;**49**:103-114.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A and Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999;**14**:3077-3079.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S and 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.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O and Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005b;**11**:300-308.
- Lanzendorf SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S and Hodgen GD. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil Steril* 2001;**76**:132-137.

- Leibo SP. Cryobiology: preservation of mammalian embryos. *Basic Life Sci* 1986;**37**:251-272.
- Liebermann, J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential Importance of vitrification in Reproductive Medicine. *Biol Reprod* 2002;**67**:1671-1680.
- Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P and Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now?. *Reprod Biomed Online* 2003;**7**:623-633.
- Lobo RA. Early ovarian ageing: a hypothesis. What is early ovarian ageing?. *Hum Reprod* 2003;**18**:1762-1764.
- Ludwig M, Gembruch U, Bauer O and Diedrich K. Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in a spontaneous pregnancy with fetal and placental triploidy: information about the general pathophysiology of OHSS. *Hum Reprod* 1998;**13**:2082-2087.
- Lutjen P, Trounson A, Leeton J, Findlay J, Wood C and Renou P. The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature* 1984;**307**:174-175.
- Makabe S, Naguro T and Stallone T. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microsc Res Tech* 2006;**69**:436-449.
- Mancino P, Moretti S, Cocola M, Greco E, Bartolacci A and Russo R. Hydatidiform mole. A case of hydrothorax, expression of a non-neoplastic complication. *Minerva Ginecol* 1999;**51**:103-105.
- Mathur R, Kailasam C and Jenkins J. Review of the evidence base of strategies to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Fertil (Camb)* 2007;**10**:75-85.

- Mathur RS, Akande AV, Keay SD, Hunt LP and Jenkins JM. Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000;**73**:901-907.
- Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys* 1990;**17**:53-92.
- Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M and Casper RF. Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Hum Reprod* 2001;**16**:2118-2123.
- Morice P, Josset P, Chapron C and Dubuisson JB. History of infertility. *Hum Reprod Update* 1995;**1**:497-504.
- Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CL, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong YC and Goh VH. Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet* 1988;**2**:790.
- Oktay K, Cil AP and Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006;**86**:70-80.
- Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y and Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod* 2004;**19**:1591-1597.
- Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;**340**:17-18.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;**164**:666.
- Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O and Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;**68**:724-726.

- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2008;**90**:S188-93.
- Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril* 2013;**99**:37-43.
- Racowsky C. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J Reprod Fertil* 1985;**74**:9-21.
- Rall WF and Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;**313**:573-575.
- Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J and Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 2004;**19**:655-659.
- Rock J and Hertig AT. Information regarding the time of human ovulation derived from a study of 3 unfertilized and 11 fertilized ova. *Am J Obstet Gynecol* 1944;**47**:343-356.
- Rotmensch S and Scommegna A. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome associated with hypothyroidism. *Am J Obstet Gynecol* 1989;**160**:1220-1222.
- Russell JB, DeCherney AH and Hobbins JC. A new transvaginal probe and biopsy guide for oocyte retrieval. *Fertil Steril* 1987;**47**:350-352.
- Saito T, Hiroi M and Kato T. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biol Reprod* 1994;**50**:266-270.
- Soares SR, Velasco JA, Fernandez M, Bosch E, Remohi J, Pellicer A and Simon C. Clinical factors affecting endometrial receptiveness in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2008;**89**:491-501.

Spallanzani L. Dissertations relative to the natural history of animals and vegetables. London 1874:Vol 2:195-199.

Stachecki JJ, Cohen J, Schimmel T and Willadsen SM. Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconventional freezing medium. *Cryobiology* 2002;**44**:5-13.

Stephens PC and Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;**2**:366.

Taher BM, Ghariabeh RA, Jarrah NS, Hadidy AM, Radaideh AM and Ajlouni KM. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome caused by hypothyroidism in an adult. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;**112**:107-109.

Trounson A and Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;**305**:707-709.

Vajta G and Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006;**65**:236-244.

Van Blerkom J and Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992;**7**:379-390.

Van Leeuwenhoek A. De natis è semine genitali animacules. *R Soc Lond Philos Trans* 1678;**12**:1040-1043.

Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 1972;**178**:411-414.

Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH and Buckner PJ. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 1951;**113**:247.

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997;**12**:1750-1755.

Yap JK and Davies M. Fertility preservation in female cancer survivors. *J Obstet Gynaecol* 2007;**27**:390-400.

Zalel Y, Katz Z, Caspi B, Ben-Hur H, Dgani R and Insler V. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome concomitant with spontaneous pregnancy in a woman with polycystic ovary disease. *Am J Obstet Gynecol* 1992;**167**:122-124.

