

## La vitrificación de ovocitos: una técnica válida, rápida y sencilla

### *The vitrification of oocytes: a valid, quick and simple technique*

Gallego Terris F., Calafell R., Salva Garau J.J., Darder Andreu B.

CEFIVBA, Centro de Fecundación in Vitro Balear. USP Clínica PalmaPlanas. Palma de Mallorca.

#### **Resumen**

**Objetivos:** *La valoración de un protocolo de vitrificación de ovocitos diseñado por el Dr. Pierre Vanderzwalmen en nuestro laboratorio de Reproducción asistida. Diseño del estudio: Para el presente estudio se han utilizado ovocitos maduros microinyectados con la técnica de ICSI en los que no se han observado signos de fecundación. Se han vitrificado y posteriormente desvitrificado para evaluar la tasa de supervivencia morfológica. Ámbito: Laboratorio de embriología de CEFIVBA, Centro de Fecundación in Vitro Balear. Población estudiada: ovocitos no fecundados de pacientes que se han sometido a un tratamiento de reproducción asistida. Variables principales de la valoración: Para la evaluación de la supervivencia del ovocito se ha tenido en cuenta la membrana citoplasmática, el citoplasma, la zona pelúcida no fracturada y la visualización del primer corpúsculo polar. Resultados: Se ha obtenido una supervivencia morfológica del 87,5% (n=40). Conclusiones: La vitrificación de ovocitos es un método válido, rápido y sencillo.*

**Palabras clave:** Vitrificación. Ovocito. Crioprotector

#### **Summary**

**Objective:** *To determinate a oocyte vitrification protocol designed by the Dr. Pierre Vanderzwalmen in our laboratory of Assisted Reproduction. Study Design: It has been used for the present study unfertilized mature oocytes after the intracytoplasmic sperm injection. To evaluate the morfolological survival rate of vitrificated oocytes. Setting: Embriology laboratory of CEFIVBA "Centro de Fecundación in Vitro Balear". Studied population: Unfertilized oocytes from patients ongoing assisted reproduction treatment. Main outcome measure (s): to evaluate oocyte survival, we observe the cytoplasmatic*

---

**Correspondencia:** Felipe Gallego Terris  
C/ José Manuel Ferreira Penedo, 5-3º J  
15145 LARACHA (La Coruña)  
gallegoterris@gmail.com

*membrane, the cytoplasm, the unrupture pellucida zone and the visualization of the first polar body.*  
*Result (s): The morfological survival it has been of 87.5% (n=40). Conclusion (s): This protocol oocyte vitrification is valid, quick and simple.*

**Key words:** Vitrification. Oocyte. Crioprotector.

## INTRODUCCIÓN

La crioconservación de los gametos masculinos es una técnica sencilla, rápida, fiable e indispensable en un laboratorio de Reproducción Asistida. En cuanto a la congelación de gametos femeninos resulta igualmente indispensable, pero desgraciadamente no podemos extrapolar las demás características de la congelación de los gametos masculinos.

Son muchas las pacientes que pueden verse beneficiadas con la crioconservación de sus óvulos maduros.

Las pacientes que padezcan cáncer y hayan de someterse a quimioterapia, tienen la posibilidad de preservar su fertilidad mediante la congelación de óvulos antes de iniciar la terapia, ya que los tratamientos para el cáncer pueden dañar el material genético de sus óvulos y puede causar esterilidad en la mujer. La congelación de óvulos no podría realizarse en pacientes prepúberes, ni en pacientes con cáncer dependiente de esteroides, donde la única solución para preservar su fertilidad sería la congelación de tejido ovárico.

También sería de gran utilidad en los tratamientos de Fecundación in Vitro en los que puedan surgir imprevistos, como sería el caso de la no obtención de la muestra seminal; de este modo evitaríamos la pérdida de estos óvulos obtenidos, que podrían ser utilizados posteriormente.

Cada día, las mujeres retrasan más el momento de tener hijos por razones sociales, laborales o económicas, y la congelación ovocitaria permitiría retrasar esta edad sin que por ello se produzca una pérdida de la calidad ovocitaria. Las candidatas ideales para la congelación de óvulos serían mujeres de menos de 40 años, con niveles hormonales basales de FSH normales, que por una razón u otra quieran ser madres pero que saben que no va a ser posible en un corto o medio periodo de tiempo.

Otra posible utilidad es la vitrificación de óvulos madurados in vitro el día después de la punción ovárica, pudiéndose conservarlos para sumarlos a posibles futuras punciones.

Actualmente hay una corriente que insiste en las ventajas de la transferencia de un único embrión (1). Esto puede dar lugar a un aumento de embriones sobrantes, o a una limitación de los ovocitos a microin-

yectar. La crioconservación de esos ovocitos podrían utilizarse en un futuro tratamiento o para la donación a otras parejas.

Asimismo sería interesante la creación de un banco de ovocitos, pudiéndose eliminar así el proceso de sincronización donante-receptora, así como destinar siempre a las receptoras un número consensuado de óvulos, eliminando la posibilidad de una baja recuperación ovocitaria de la donante.

Aunque el primer nacido vivo de ovocito congelado fuera hace 21 años (2), la eficacia de la congelación convencional sigue siendo baja, situándose la tasa de supervivencia en torno al 50-60% (3, 4) por lo que es una técnica que ha tenido poca implantación en los laboratorios de Reproducción asistida. Recientes y diversos estudios muestran unas muy buenas tasas de supervivencia, fecundación y embarazo con la vitrificación de ovocitos (5, 6). En una revisión de la bibliografía de los últimos 5 años, no se encuentran ninguna circunstancia en que la congelación convencional ofrezca alguna ventaja considerable respecto a la vitrificación. Los autores van mas allá y afirman que no es necesario disponer un congelador programable en los laboratorios de FIV, ya que la vitrificación es una técnica válida para cualquier estadio celular (7).

En otra revisión de la bibliografía se encontró que tanto la congelación convencional como la vitrificación de ovocitos eran válidos, aunque la tasa de éxito en la congelación convencional era menor (8).

Aún así hay publicaciones donde se constatan muy buenas tasas de supervivencia, fecundación y embarazo con la congelación convencional de ovocitos (9).

Dadas las ventajas de la crioconservación de ovocitos, nuestro centro esta valorando la utilización de un protocolo de vitrificación de ovocitos diseñado por el Dr. Pierre Vanderzwalmen, del Centre de Procréation Assistée du CHIREC (Centre hospitalier interrégional Edith Cavell) en Bruselas, Bélgica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La vitrificación suele realizarse usando dos soluciones de crioprotectores, donde la primera suele tener entre un 20-50% de la concentración de criopro-

tectores de la segunda. La estrategia más utilizada es incubar como máximo 3 minutos en la primera solución y unos pocos segundos en la segunda. Esta estrategia es utilizada en blastocistos con muy buenos resultados, pero en células donde hay una baja proporción superficie-volumen, como los ovocitos, la mejor estrategia es al incubación de entre 5-15 min. en la primera solución y 1 minuto en la segunda. Se incrementa levemente el efecto tóxico de los crioprotectores, pero estos dan una mejor protección a la célula.

Se debe evitar que el cambio de volumen del ovocito durante la vitrificación y desvitrificación sea superior al 30% (10). Una manera de evitarlo es incubando el ovocito a vitrificar en diferentes diluciones crecientes del primer medio de vitrificación. Un estudio no publicado de P. Vanderzwalmen muestra como con la vitrificación por pasos se evita que la diferencia de volumen durante la salida y la entrada de agua y crioprotector sea mayor al 30% consiguiéndose una mejor calidad embrionaria al tercer día post microinyección, que con la vitrificación en un solo paso.

Para probar la eficiencia de los medios de vitrificación se han usado ovocitos MII en los que no se han encontrado signos de fecundación después de 43 horas post microinyección, y por tanto, descartados del proceso de fecundación in vitro.

Para la vitrificación se utiliza un medio base, G-MOPS suplementado con un 20% HSA, un primer medio de vitrificación formado con una base de G-MOPS o PBS o HTF-HEPES suplementado con un 20% HSA, 7,5% de ethylene glycol (EG) y 7,5% de Dimethyl sulphoxide (DMSO). El primer medio (MV1) sirve para obtener un estado intracelular que facilita la vitrificación. El segundo medio (MV2), también con un 20% HSA, 20% de DMSO y EG, 0,75M de sacarosa y Ficoll (10 mg/ml) sirve para obtener el estado extracelular.

Los ovocitos se incuban de dos a tres minutos en una primera gota con G-MOPS +20% HSA, 3 min. en una dilución 1/16 de V<sub>1</sub>, 3 min. en dilución 1/8 de MV<sub>1</sub>, 3 min. en dilución 1/4 de MV<sub>1</sub>, 3 min. en dilución 1/2 de V<sub>1</sub>, 5 min. en la solución MV<sub>1</sub> y entre 30-40 seg. en la solución MV<sub>2</sub>. Seguidamente se recoge con un volumen de aproximadamente 1µl y se guardan en las pajuelas de High Security System de Cryo Bio System, diseñadas por Pierre Vanderzwalmen. Utilizamos estas pajuelas porque son asépticas y aunque sacrificamos de esta forma la elevada velocidad de enfriamiento de otras pajuelas cuyo sistema es el contacto directo del medio de los ovocitos con el nitrógeno líquido, no por ello se obtienen peores resultados (11). Una vez cerrada herméticamente la pajue-

la con una selladora de pajuelas convencional, se introduce de golpe y verticalmente en un recipiente de nitrógeno líquido, a la vez que se agita suavemente para evitar que el vapor que forma el nitrógeno líquido al contactar con una superficie más caliente reduzca la velocidad de enfriamiento.

Para la desvitrificación de los ovocitos se usa una solución 1M de sacarosa al 15-20% HSA. En una placa Falcon ref. 35-1008 se vierten 3-4 ml de la solución. En esta solución es donde pondremos directamente la parte de la pajuela donde están los ovocitos. Estas pajuelas, a diferencia de otras, tienen la ventaja que en un mismo paso se produce la descongelación y la toma de contacto del ovocito con la primera solución de desvitrificación. En esta solución se deja 2 min. Seguidamente se incuban 4 min. en cada solución de 0,75M, 0,5M y 0,25 M de sacarosa al 15-20% HSA. Por último dos minutos en dos gotas de G-MOPS al 15-20% HSA. De ahí a una placa con medio de cultivo gaseado, donde al cabo de 15 min. se pasan a otra gota de cultivo para eliminar los últimos restos de crioprotector que pueda expulsar el ovocito.

Está demostrado que al añadir concentraciones mayores de crioprotector, disminuye la temperatura en la que el agua en estado libre forma cristales. No hay un límite, con lo que con altas concentraciones de crioprotector nunca se formará hielo, sino un estado vitrificado.

Con la vitrificación se consigue por tanto la solidificación de la solución y del ovocito a bajas temperaturas sin la formación de cristales. Es un proceso que combina una alta concentración de crioprotectores con una alta velocidad de enfriamiento. Los crioprotectores evitan la formación de hielo, ya que estos no pueden incorporarse en las uniones de las moléculas de agua que forman los cristales, por lo que se acumulan entre los cristales, evitando su crecimiento. La alta velocidad de enfriamiento no da tiempo para la formación de los cristales.

El aumento de la viscosidad necesaria para la vitrificación se consigue con altas concentraciones de crioprotectores, los cuales son tóxicos para las células. Esto ha provocado una reticencia en los laboratorios de reproducción humana al uso de la vitrificación.

En presencia de estas altas concentraciones de crioprotectores penetrantes, los ovocitos y embriones sólo pueden estar cortos periodos de tiempo antes de sufrir daños. Es por eso que en los medios de vitrificación se suelen utilizar también polímeros de elevado peso molecular y baja toxicidad, como el Ficoll o el Dextran. Con ello se ha conseguido mejores resultados de supervivencia al reducir también la concen-

tración necesaria de crioprotectores penetrantes (12). Sin embargo, en una publicación de Lieberman J et al (13) no se encuentran diferencias estadísticamente significativas con el uso o no de estos polímeros en una serie de 1000 ovocitos congelados

Para hacer las soluciones de vitrificación se suele utilizar crioprotector permeables de bajo peso molecular (EG, DMSO, propanediol, glicerol) y crioprotector no permeables de alto peso molecular (Ficoll, Dextran, PEG) y de bajo peso molecular como la sacarosa.

## RESULTADOS

En este trabajo se ha valorado la supervivencia morfológica de los ovocitos maduros. Se ha valorado la membrana citoplasmática, el citoplasma y la zona pelúcida, así como la correcta visualización del primer corpúsculo polar.

Se han vitrificado 40 ovocitos maduros en los que no se había visualizado ninguna señal de fecundación 43 horas después de la microinyección. Han sobrevivido morfológicamente 35 (87,5%) de los 40 ovocitos. De los 35 ovocitos, en 5 (14,3 %) se visualiza un citoplasma ligeramente granuloso y en 3 (8,6%) el primer corpúsculo polar estaba lisado, aunque se podía visualizar perfectamente su ubicación.

## DISCUSIÓN

El ovocito maduro tiene una serie de características que lo hacen especialmente sensible a temperaturas no fisiológicas y a su crioconservación.

La vitrificación, a diferencia de la congelación convencional, evita que el ovocito se exponga a temperaturas no fisiológicas durante su crioconservación, evitando por tanto daños en el huso meiótico, muy sensible a bajas temperaturas (14).

Una característica del ovocito es su baja proporción superficie-volumen, que influye negativamente en la velocidad de penetración de los crioprotectores. Esto incrementa el riesgo de la formación de cristales intracelulares con la congelación convencional.

El ovocito maduro está detenido en la metafase de su segunda división meiótica. Tiene los cromosomas fuertemente unidos al huso meiótico, sin una membrana nuclear que los proteja. Tienen extruido el primer corpúsculo polar, como resultado de la finalización de la primera división meiótica.

El huso meiótico es una estructura compuesta por microtúbulos de (-tubulina en equilibrio con (+tubuli-

na en estado libre. Este equilibrio puede variar debido a cambios fisiológicos a los que pueda estar expuesto el ovocitos (temperatura, osmolaridad...)

Los microtúbulos son esenciales para la maduración y desarrollo del ovocito y dicta la distribución de los cromosomas en las divisiones celulares.

El huso meiótico es esencial para completar la segunda meiosis, así como para la extrusión del segundo corpúsculo polar, la migración de los pronucleos y la formación del primer huso mitótico. Si resulta dañado aumenta el riesgo de aneuploidías en los embriones, aumento de fecundación anómala y bloqueo en el desarrollo, tanto en estadio pronuclear como embrionario.

Los daños causados por la vitrificación pueden ser de tipo químico, debido a la alta concentración de crioprotector (del orden del 5-7M respecto al 1,5M de la congelación convencional), de tipo físico, debido a la posible formación de hielo intracelular y por último, el daño causado por el estrés osmótico durante la adición y posterior retirada de los crioprotectores. Estos dos últimos están fuertemente relacionados con una disminución de la permeabilidad de la membrana.

Inmediatamente después de la descongelación, la beta-tubulina se encuentra despolimerizada. Al cabo de dos horas la beta-tubulina repolimeriza, formando husos meióticos normales correctamente alineados a los cromosomas. Los ovocitos maduros de ratón tienen la propiedad de reparar la disrupción de una manera más eficiente que los humanos, por lo que la congelación de ovocitos ratón es más eficiente que en humanos. La no repolimerización correcta produce un elevado número de aneuploidías. Por tanto, antes de microinyectar hay que dejar incubar los ovocitos un tiempo prudencial, para permitir la correcta repolimerización de huso meiótico antes de microinyectar. Chen Su utiliza un tiempo de 3 horas post descongelación con buenos resultados (15).

Afortunadamente, los ovocitos tienen una gran capacidad de repolimerizar el huso meiótico. Un estudio de Wang et al (16) encontró que hasta el 42% de los MII descongelados en los que no había podido visualizar el huso meiótico, fecundaban.

Otras estructuras de los ovocitos maduros son los microfilamentos, esenciales para la rotación del huso, la extrusión del corpúsculo polar, migración pronuclear y la división celular. Están formados por actina polimerizada, y, al igual que los microtúbulos, están en equilibrio con la actina libre, equilibrio que también puede verse alterado por la crioconservación.

Las mitocondrias de los ovocitos pueden también resultar dañadas, ya que pueden ver reducida su pola-

ridad y por tanto su actividad respiratoria. La disminución de la permeabilidad de la membrana de las mitocondrias puede disminuir la capacidad de aumentar los niveles de calcio intracelular, necesario para la fecundación y la implantación del embrión en el endometrio (17). Cuando penetra un espermatozoide en el óvulo, tiene lugar un rápido aumento de la respiración y del metabolismo del óvulo que hace posible el proceso de la fecundación. Este aumento es posible gracias a la liberación del Calcio almacenado.

El uso de DMSO provoca una exocitosis prematura de los gránulos corticales en ovocitos de ratón, produciendo cambios en las glicoproteínas de la zona pelúcida, volviéndola impenetrable para los espermatozoides. Este proceso no se inicia normalmente hasta la penetración de un espermatozoide, a fin de evitar la poliespermia. Es muy probable que esta exocitosis prematura se da también en ovocitos humanos, por lo que la ICSI será la técnica de elección para la fecundación de los ovocitos vitrificados. La presencia de albúmina antes y durante la exposición del DMSO reduce significativamente los cambios en la zona pelúcida, aunque no reduce la exocitosis de los gránulos corticales (18).

En un análisis del huso meiótico y el desarrollo posterior a embrión después de la FIV de ovocitos descongelados indica que la vitrificación es un procedimiento menos traumático que la congelación convencional (19).

Sea utilizando la congelación convencional o la vitrificación, es necesaria la implantación de las técnicas de crioconservación de ovocitos en los laboratorios de Reproducción asistida, según los argumentos expuestos anteriormente. La ley española 14/2006, en el artículo 11 apartado dos indica: "La utilización de ovocitos y tejido ovárico crioconservados requerirá previa autorización de la autoridad sanitaria correspondiente". Por tanto no hay restricción legal para la congelación de ovocitos, pero si es necesario una autorización para su descongelación y utilización en técnicas de reproducción asistida.

Hoy en día existen muchos protocolos de vitrificación de ovocitos y embriones, y muchos sistemas de almacenaje. Para que realmente haya una implantación de estas técnicas, es necesaria una estandarización de los protocolos y resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Dare MR, Crowther CA, Dodd JM, Norman RJ.:** Single or multiple embryo transfer following in vitro fertilisation for improved neonatal outcome: a system-

atic review of the literature. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2004 Aug; 44 (4): 283-91.

2. **Chen C.:** Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet.* 1986 Apr 19;1 (8486): 884-6.
3. **Boldt J, Cline D, McLaughlin D.:** Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Hum Reprod.* 2003 Jun;18 (6): 1250-5. Erratum in: *Hum Reprod.* 2004 Aug;19 (8): 1929.
4. **Borini A, Bonu MA, Coticchio G, Bianchi V, Cattoli M, Flamigni C.:** Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. *Fertil Steril.* 2004 Sep; 82 (3):601-5.
5. **Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP.:** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2005 Sep; 11 (3): 300-8.
6. **Chen ZJ, Li Y, Hu JM, Li M.:** [Successful clinical pregnancy of cryopreserved human oocytes after vitrification] *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006 Aug 8; 86 (29): 2037-40.
7. **Vajta G, Nagy ZP.:** Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online.* 2006 Jun;12 (6):779-96.
8. **Kuleshova LL, Lopata A.:** Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril.* 2002 Sep;78 (3): 449-54. Review.
9. **Li XH, Chen SU, Zhang X, Tang M, Kui YR, Wu X, Wang S, Guo YL.:** Cryopreserved oocytes of infertile couples undergoing assisted reproductive technology could be an important source of oocyte donation: a clinical report of Successful pregnancies. *Hum Reprod.* 2005 Dec; 20 (12):3390-4. Epub 2005 Aug 11.
10. **Newton H, Pegg DE, Barrass R, Gosden RG.:** Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocytes. *J Reprod Fertil.* 1999 Sep;117 (1): 27-33.
11. **Camus A, Clairaz P, Ersham A, Van Kappel AL, Savic G, Staub C.:** [The comparison of the process of five different vitrification devices] *Gynecol Obstet Fertil.* 2006 Sep; 34 (9):737-45. Epub 2006 Sep 8. French.
12. **Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO.:** Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology.* 2001 Aug; 43 (1): 21-31.
13. **Liebermann J, Tucker MJ, Sills ES.:** Cryoloop vitrification in assisted reproduction: analysis of survival rates in > 1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2003; 30 (2-3):125-9.
14. **Sathananthan AH, Trounson A, Freemann L, Brady T.:** The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod.* 1988 Nov; 3 (8):968-77.

15. **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 Jul; 20 (7):1975-80. Epub 2005 Mar 24.
16. **Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL.:** Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod.* 2001 Jul;16 (7): 1464-8.
17. **Jones A, Van Blerkom J, Davis P, Toledo AA.:** Cryopreservation of metaphase II human oocytes affects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Hum Reprod.* 2004 Aug; 19 (8):1861-6. Epub 2004 Jun 30.
18. **Vincent C, Turner K, Pickering SJ, Johnson MH.:** Zona pellucida modifications in the mouse in the absence of oocyte activation. *Theriogenology.* 2007 Jan 1;67 (1): 64-72. Epub 2006 Oct 17.
19. **Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman MG.:** Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Reprod Biomed Online.* 2006 Jun;12(6):779-96.