

La vitrificación permite obtener tasas de embarazo comparables a las obtenidas con embriones en fresco

Vitrification to obtain pregnancy rates comparable to those obtained with fresh embryos

Mónica Dorado¹, Mercedes González¹, María Hebles², Beatriz Migueles¹, Laura Aguilera², Pascual Sánchez², Amelia Rodríguez², José Antonio Lara², Natalio Cruz², Fernando Sánchez²

¹Fundación Guadalquivir de Investigación Médica. Sevilla. ²Clínica Ginemed, Sevilla.

Resumen

El objetivo de este estudio es comparar el porcentaje de embarazo de transferencias de embriones en fresco y en vitrificados.

Se realizó un análisis retrospectivo de las tasas de embarazo desde que empezamos a realizar vitrificación de embriones en la clínica Ginemed, especializada en reproducción humana asistida.

Se compararon las tasas de embarazo de los ciclos en fresco realizados en la clínica desde enero de 2007 hasta septiembre de 2008 con las tasas obtenidas en transferencias de vitrificados de aquellos embriones que no habían dado embarazo en fresco.

La tasa de embarazo en transferencias en fresco fue del 49,8% de 1279 ciclos realizados. Tras la vitrificación de los embriones sobrante de estos ciclos, se realizaron 184 ciclos de vitrificados consiguiendo una tasa de embarazo del 41%.

No se observaron diferencias significativas en transferencias en función de la calidad de embriones en frescos y en vitrificados (1 bueno: 37,5% frente 38%, 2 buenos: 55% frente 47%, 3 buenos: 57% frente a 51% respectivamente).

Tampoco encontramos diferencias con respecto a la tasa en función de la edad de las pacientes en fresco y vitrificados.

En conclusión, la vitrificación es una técnica que nos permite conservar los embriones sobrantes de ciclos de reproducción asistida manteniendo intacta la funcionalidad de embriones. Nos permite cancelar ciclos por riesgo de hiperestimulación o por mala calidad endometrial sin comprometer la calidad embrionaria y las tasas de embarazo.

Palabras clave: Porcentaje de embarazo. Vitrificación. Warming. Edad materna. Calidad embrionaria

Correspondencia: Dra. Mónica Dorado Silva
Clínica GINEMED. Laboratorio FIV.
c/ Farmacéutico Murillo Herrera
41010, Sevilla, España
mdorado@ginemed.es

Summary

The object of this study is a comparison between the rates of pregnancy proceeding from a transfer with fresh embryos and vitrified embryos.

The investigation was made as a retrospective analysis about the success rates since we choose to realize the embryo vitrification in the Ginemed Clinic, specialized in assisted human reproduction.

The comparison was made between the pregnancy rates proceeding from a fresh embryos cycle from January 2007 to September 2008 and the pregnancy rates proceeding from transfers realized with vitrified embryos, which didn't give before a positive pregnancy result by their employment as fresh embryos.

We obtained significant results: the pregnancy rate (PR) in cycle by employing fresh embryos was 49.8% in about 1279 realized transfer. After the vitrification of remaining embryos of this cycle, it was realized 184 cycle of embryo vitrification getting a 41% as PR result.

It wasn't observed significant differences by employment in transfer of good quality fresh and vitrified embryos (1 good: 37.5% versus 38%, 2 good: 55% versus 47%, 3 good: 57% as opposite to 51% respectively). It was any differences, as well, respect to the PR based on the Age of the patients by transfer with fresh and vitrified embryos.

As conclusion of this study can be affirmed that vitrification is a technique that allows to conserve the leftover embryos maintaining their functionally intact at the same time. Thus we can delay transfer without jeopardizing the embryonic quality and the PR.

Key words: Pregnancy rate. Vitrification. Warming. Maternal age. Embryo quality

INTRODUCCIÓN

La conservación de embriones desempeña un papel muy importante en la reproducción humana asistida. El proceso de estimulación ovárica se intenta optimizar al máximo, procurando obtener un número suficiente de embriones donde seleccionar los de mejor calidad para transferir y el resto poder congelar para un segundo intento. De esta forma conseguimos aumentar la tasa acumulativa de embarazo reduciendo la exposición a gonadotropinas (1,2).

Existen dos técnicas básicas utilizadas para la criopreservación de embriones: congelación lenta y vitrificación. La congelación lenta induce daños celulares, alteración del metabolismo y descenso de la viabilidad (3).

La vitrificación es un método de criopreservación en el que se enfrían las soluciones a altas velocidades para solidificarlas sin formar cristales de hielo, esto minimiza los inconvenientes de la congelación lenta. El enfriamiento se realiza en un solo paso a una velocidad de $-23.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (4). Nosotros utilizamos la técnica del cryotop. Esta técnica reduce el choque osmótico, la toxicidad del crioprotector y los daños causados por el enfriamiento, al tiempo que aumenta el rango de supervivencia y la tasa de embarazo (5,6).

El objetivo de nuestro estudio es comparar las tasas de embarazo en pacientes sometidos a ciclos de

reproducción asistida en transferencias en fresco y en vitrificados.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio ha sido realizado en la Clínica Ginemed en Sevilla, España. Todos los ciclos fueron ciclos de ICSI. La técnica de Vitrificación se introdujo a finales de 2006 aceptándose como única técnica de criopreservación de embriones desde enero de 2007. Entre enero de 2007 y septiembre de 2008 se realizaron un total de 1279 ciclos con transferencias en fresco. En 715 de ellos vitrificamos al menos 1 embrión, realizándose un total de 184 ciclos de transferencias con embriones vitrificados hasta este periodo.

Se incluyeron todos los ciclos en los que hubo embriones para transferir en fresco. En transferencias de vitrificados, incluimos todas aquellas en las que había habido transferencia en fresco y no habían quedado embarazadas. La media de edad en transferencia en fresco y en vitrificados fue similar (34,8 frente a 35,5 años respectivamente).

Los ciclos de ICSI se realizaron en protocolo largo tras un mes de reposo ovárico con anticonceptivos. Para la supresión se ha usado análogos de la GnRH (aGnRH), nafarelina (Synarel®) comenzando en el Día 14º de anticonceptivos en una dosis de 200 mg

dos veces al día, manteniéndolo hasta el día de la HCG. Según los niveles séricos de FSH, LH y estradiol y en función de la edad de la paciente y análisis por ecografía se fijan las dosis de estimulación ovárica. Nosotros utilizamos el protocolo "Combo" con hormona folículo estimulante (FSH) (Gonal-F®) y gonadotropina menopáusica humana, HMG (HMG Lépori®) en dosis entre 150UI a 300UI. La administración de estos se individualiza de acuerdo al control ecográfico del ciclo. El criterio para la administración de la hormona gonadotrófica humana (1000 UI HCG) (HCG Lépori®) es la presencia de al menos dos folículos de 18 mm. de diámetro. La administración de aGnRH y FSH/HMG se suspende el día de la administración de la HCG. Las punciones se realizaron a las 36 horas de la administración de la hCG por vía vaginal ecoguiada.

Las muestras de semen usadas para ICSI se prepararon por gradiente de densidad en capas de 0,3 a 1 mL de 40% y de 0,3 a 1 mL de 80% de Sperm Grad (Vitrolife®) y Ham F-10 (Gibco) con gentamicina a 1100 rpm durante 20 minutos. Realizando después un lavado con Quinn's® Sperm Washing Medium (Sage) y otro con Quinn's Advantage® Fertilization (HTF) Universal Medium (Sage) a 1500 rpm 5 minutos.

La microinyección se realizó entre las 3 y 6 horas de la captación ovocitaria descrita en detalle por Svalander et al.(7)

Previamente el cúmulo fue eliminado con HYASE 10 (Vitrolife®) en Quinn's Advantage® Fertilization (HTF) Universal Medium (Sage) en microgotas de 25 µL, ahí se dejaban unos segundos y finalmente pasando repetidas veces por micropipetas estiradas de distintos diámetros en Quinn's Advantage® Fertilization (HTF) Universal Medium (Sage). La fecundación se evaluó a las 16-20 horas.

A los 2 ó 3 días de la punción se realizó la transferencia de un máximo de los 3 embriones de mejor calidad. El tratamiento con progesterona (Progeffik(r)) se mantiene igual hasta el día de la B-hCG (dos semanas) y si ésta es positiva se mantiene hasta el tercer mes de embarazo.

La vitrificación se realizó con la técnica de Cryotop (8). Los embriones fueron vitrificados en día +2,+3 ó +5 en función del día que se realizó la transferencia en fresco. Se introdujeron en una solución estabilizadora (15% de etilenglicol y dimetilsulfóxido) durante 7 minutos pasando después a la solución de vitrificación (15% de etilenglicol, 15% de dimetilsulfóxido y sucrosa) donde permanecen menos de 1 minuto antes de ser cargados en el cryotop con el mínimo volumen y sumergirlos en nitrógeno líquido.

Los embriones se desvitrificaron mediante un calentamiento rápido (12.000 °C/min) en Thawing Solution con 1 µl de sucrosa a 37°C durante menos de 1 minuto. Posteriormente se equilibraron en Dyluent Solution con 0.5 µl de sucrosa durante 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se pusieron en medio de cultivo Quinn's Advantage® Cleavage Medium o Quinn's Advantage® Blastocyst Medium (en función del día de la congelación) hasta la hora de la transferencia al día siguiente o en caso de blastocistos durante al menos 4 horas en el incubador al 6% de CO2 a 37°C.

El análisis estadístico se obtuvo aplicando contraste de hipótesis de igualdad de proporción poblacional con un nivel de significación <0.05 con el software comercial SigmaStat 3.1.

RESULTADOS

Se transfirieron un total de 3896 embriones. La media de embriones transferidos en fresco fue de 2.64 por ciclo frente a los 2.46 embriones transferidos en ciclos de vitrificados.

La tasa de supervivencia de los embriones vitrificados fue del 91%, la mayoría con todas las blastómeras intactas, de los cuales el 76 % evolucionaron desde la desvitrificación hasta el momento de la transferencia.

El porcentaje de embarazo en frescos y en vitrificados no mostró diferencias significativas en función de la calidad de los embriones (Tabla 2) ni por la edad de las pacientes (Tabla 3). En cambio, si encontramos diferencias en función de los endometrios (Tabla 4 y Tabla 5).

DISCUSIÓN

La vitrificación proporciona una supervivencia, evolución y tasa de embarazo superior a la obtenida con la congelación lenta (9), hechos que nos hicieron decidirnos para cambiar a esta técnica.

La vitrificación es una técnica relativamente nueva y es necesario observar el efecto que puede provocar en los niños nacidos tras aplicar esta técnica. Un estudio de Takahashi et al. (10) comparó los resultados perinatales de transferencia de vitrificados y de frescos y no encontró diferencias significativas en la edad gestacional, peso al nacer o defectos congénitos; aunque no por ello haya que dejar de seguir investigando.

En nuestro estudio hemos comparado las tasas de embarazo evolutivos que conseguimos durante los

años 2007-2008 sin seleccionar y las comparamos con aquellas que obtuvimos con los embriones que vitrificamos de esos ciclos y aportaron un resultado negativo en fresco. Observamos que el porcentaje de embarazo es similar en fresco y en vitrificado (tabla 1). Este estudio compara ciclos en fresco sin seleccionar con embriones que no han sido seleccionados para ser transferidos en fresco y han sido vitrificados. Por tanto estos embriones considerados "no tan buenos" deberían dar una tasa menor de embarazo si hubieran sido transferidos en fresco y aún más baja al haber sufrido el proceso de vitrificación/ warming. Sin embargo esto no se observa, lo que nos hace pensar, dado que la funcionalidad del embrión tras la desvitrificación permanece intacta, que la tasa ligeramente inferior de embarazos en vitrificados se puede deber únicamente a la calidad de esos embriones.

Tabla 1

Tasas de embarazos en transferencias en fresco frente a transferencias en vitrificado

	Frescos	Vitrificados	p
2007-2008	49.70%	41%	0.064

Si nos fijamos más y tratamos de encontrar diferencias significativas vemos que no las encontramos ni siquiera cuando diferenciamos por calidad embrionaria (tabla 2) o por edad (tabla 3). Estos datos reafirman que la funcionalidad del embrión tras la desvitrificación permanece intacta.

Tabla 2

Tasas de embarazos en fresco vs vitrificado según el número de embriones de buena calidad transferidos

	Frescos	Vitrificados	p
0	26%	8%	N.V*
1	37.5%	38%	0.8
2	55%	47%	0.18
3	57%	51%	0.23

*N.V no valorable por bajo tamaño muestral

Tabla 3

Tasas de embarazo según la edad de las pacientes (sin ovodon)

	Frescos	Vitrificados	p
≤30	58.4%	45.5%	0.19
>30 Y ≤ 38	53.3%	42.8%	0.17
>38	15.8%	25%*	N.V*

*N.V no valorable por bajo tamaño muestral

Cuando comparamos el porcentaje de embarazo en fresco relacionándolo con la medida del endometrio vemos que por debajo de 9 mm se reduce (tabla 4), hecho que concuerda con los datos aportados por De Geyter (11). Si además queremos observar el efecto de la calidad de los embriones transferidos (tabla 5) comprobamos que juega un papel decisivo transferir embriones de buena calidad independientemente del endometrio. Es posible que una buena calidad embrionaria sea capaz de compensar un pobre endometrio (1). Con respecto al endometrio en transferencia de embriones vitrificados no podemos sacar conclusiones debido al bajo tamaño muestral. En nuestro estudio el porcentaje de vitrificados transferidos con endometrios <9 es muy bajo lo que nos impide poder valorarlos correctamente.

Tabla 4

Tasas de embarazo en función de la medida de los endometrios el día de la transferencia

	Frescos	Vitrificados	p
<9	45.8%	44%	0.8
9	51.7%	41.4%	0.03*

Tabla 5

Tasas de embarazo en función de la medida del endometrio y calidad embrionaria

Endom.	Frescos		Vitrificados	
	Al menos 1 bueno	0 buenos	Al menos 1 bueno	0 buenos
<9	41%	23%	42%	33%
≥9	57%	28%	43%	30%

En conclusión, la vitrificación es una técnica muy útil, que reduce los daños que produce la congelación lenta y aumenta la tasa de supervivencia, evolución y embarazo hasta tal punto que nos permite equipararlas a los ciclos en fresco. Esto representa una excelente alternativa para pacientes que tienen probabilidad de padecer síndrome de hiperestimulación ovárica pues pueden vitrificar sus embriones para ser transferidos más adelante sin que ello suponga un descenso de posibilidades que quedar embarazadas.

La vitrificación representa una excelente alternativa para pacientes que decidan mantener el resto de embriones o no realicen transferencia en fresco, para tener una segunda oportunidad de realizar una trans-

ferencia embriones vitrificados sin que ello suponga un descenso de la calidad de dichos embriones.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Veeck LL.:** Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw? *Reprod Biomed Online* 2003; 6:367-374.
2. **Anderson AR, Wilkinson SS, Price S, Crain JL.:** Reduction of high order multiples in frozen embryo transfers. *Reprod Biomed Online* 2005;10:402-5.
3. **Sheehan CB, Lane M, Gardner DK.:** The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Human Reprod* 2006;21:2978-84.
4. **kuleshova L, Lobata A.:** Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78:3,449-53.
5. **Kuwayama M.:** Vitrification of human oocytes and embryos. *IVF Update*. Tokyo: Medical View Co.,2001, 230-4.
6. **Gottumukkala Achyuta Rama Raju, Gomedhikam Jaya, Kota Murali Krishna, and Kalagara Madan.:** Neonatal outcome after vitrified day 3 embryo transfers: a preliminary study. Article in press *Fertil Steril* 2008.
7. **Svalander P, Forsberg AS, Jakobsson AH, and Wikland M.:** Factor of importance for the establishment of a successful program of intracytoplasmic sperm injection treatment for male infertility. *Fertil Steril*.1995; 63: 827-37.
8. **Kuwayama M.:** Vitrification of human oocytes and embryos. *IVF Update*. Tokyo: Medical View Co.,2001;230-4.
9. **Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, RHamilton R and Gardner DK.:** 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 2008;23:1976-82.
10. **Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C.:** Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril* 2005;84:88-92.
11. **De Geyter C, Schmitter M, De Geyter M, Nieschlag E, Holzgreve W, Schneider HP.:** Prospective evaluation of the ultrasound appearance of the endometrium in a cohort of 1.186 infertile women. *Fertil Steril* 2000;73:106-13
12. **Xingqi Zhang, Chi-Huang Chen, Edmond Confino, Randall Barnes, Magdy Milad, and Ralf R Kazer.:** Increased endometrial thickness is associated with improved treatment outcome for selected patients undergoing in vitro fertilization- embryo transfer. *Fertil Steril* 2005;83:336-40.