

Efecto de la remoción artificial del blastocele en embriones murinos antes de su congelamiento o vitrificación

Papayannis, M.M MSc; Eyheremendy, V. MSc, Sanjurjo, C. MSc, Blaquier, J. MSc PhD, Raffo. MSc, F.G.E.
FERTILAB, Medicina Reproductiva

Resumen:

Objetivo: comparar la tasa de supervivencia post-descongelamiento de embriones murinos en estadio de blastocisto luego del haber sido congelados con diferentes métodos: congelamiento lento o vitrificación y en ambos casos con y sin remoción del fluido del blastocele.

Materiales y métodos: Se separaron en dos grupos 139 blastocistos murinos expandidos. A 86 se les evacuó el líquido del blastocele y a los 53 restantes se los dejó intactos. En ambos grupos los blastocistos se cultivaron por 24 hs o se criopreservaron utilizando dos métodos diferentes: congelamiento convencional lento o vitrificación.

Resultados: La evacuación del blastocele no afecta la supervivencia de los blastocistos (grupo control cultivado 24 hs luego de la remoción del blastocele, 100% vuelven a expandir). En aquellos blastocistos que sufrieron remoción artificial del blastocele, la supervivencia post-descongelamiento se beneficia cuando el método de criopreservación utilizado fue el convencional lento (39% vs 9%); no encontrándose diferencia cuando se vitrifica (73 %vs 75%).

Conclusiones: La vitrificación es un mejor método para criopreservar blastocistos murinos que el congelamiento convencional lento.

La liberación mecánica del líquido del blastocele no mejora la tasa de supervivencia de los embriones vitrificados.

La liberación mecánica del líquido del blastocele mejora la tasa de supervivencia de los embriones congelados por el método convencional lento.

Introducción

La criopreservación de embriones humanos se ha convertido en un procedimiento de rutina para incrementar las tasas de embarazo, evitar el riesgo de embarazos múltiples y para evitar la estimulación innecesaria en procedimientos siguientes.

A pesar de las altas tasas de implantación y embarazo obtenidas luego de transferencias de blastocistos en fresco, la baja tasa de supervivencia luego de su criopreservación reduce las posibilidades luego del descongelamiento (Vanderzwalmen et al., 2002).

Los resultados del congelamiento de blastocistos mediante un protocolo de congelamiento lento (Menezo et al., 1992) han sido variables, justificando la investigación de métodos alternativos (Kaufman et al., 1995). Los blastocistos expandidos tienen una cavidad central llena de fluido, el blastocele, en el cual se pueden formar cristales de hielo durante el congelamiento. Probablemente una inadecuada penetración de los crioprotectores o una velocidad muy baja de congelamiento promueva esta formación de hielo, dañando los embriones.

Recientemente Kuleshova y Lobata (2002) han reportado que la vitrificación podría ser más favorable que el congela-

miento lento. La vitrificación tiene como ventajas que requiere solamente unos pocos segundos congelar los embriones y que no se produce cristalización intracelular.

La vitrificación consiste en la solidificación de una solución por enfriamiento rápido, formándose un estado vídrio por elevación extrema de su viscosidad. Este proceso se obtiene por el aumento de la concentración de los crioprotectores simultáneamente con la velocidad de congelamiento. Como consecuencia, los daños físicos causados por la formación de cristales de hielo extracelulares como intracelulares durante el proceso de congelamiento son eliminados. De todos modos, la toxicidad causada por las altas concentraciones de crioprotector es un defecto de esta técnica (Fahy et al., 1984; Rall et al., 1987).

El volumen de la solución de vitrificación es minimizado lo que permite disminuir el tiempo de congelamiento. Estos volúmenes pequeños se logran utilizando diferentes elementos para almacenar los embriones: the open pulled straw (Vajta et al., 1998; Chen et al., 2000a,b; Hurtt et al., 2000; Oberstein et al., 2001), the flexipet denuding pipette (Liebermann et al., 2002), micro-drops (Papis et al., 2000), electrón microscopio copper grids (Hong et al., 1999; Park et al., 2000), hemi-straw system (Kuwayama and Kato, 2000; Vandervorst et al., 2001; Vanderzwalmen et al., 2003), nylon mesh (Matsumoto et al., 2001) y cryoloop (Lane et al., 1999 a,b; Oberstein et al., 2001; Yoeman et al., 2001)

Es probable que una inadecuada permeación de los crioprotectores o una velocidad muy baja de congelamiento promueva la formación de hielo intracelular, dañando los embriones. La presencia del blastocele podría influir en el potencial de congelamiento. Vanderzwalmen et al., (2002) y Son et al., (2003) han reportado un aumento en la tasa de sobrevivencia de los blastocistos cuando el volumen del blastocele es reducido de manera artificial para disminuir la formación de cristales internos a bajas temperaturas.

El objetivo principal de este trabajo fue comparar la tasa de sobrevivencia post-descongelamiento de embriones murinos

en estadio de blastocisto luego del haber sido congelados con diferentes métodos: congelamiento lento o vitrificación, y en ambos casos con y sin remoción del fluido del blastocele.

Materiales y Métodos

Recolección de embriones

Se utilizaron para el estudio una cepa de ratones F1 de BalbC. Las hembras fueron superovuladas inyectando intraperitonealmente 5 IU de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), a las 48 horas se inyectaron con 5 IU de hCG. Inmediatamente luego de la inyección de hCG, se colocó una hembra dentro de una jaula con un solo macho. Las hembras que presentaron tapón vaginal, fueron sacrificadas por dislocación cervical 36 horas después de la inyección de hCG y los embriones de dos células fueron recolectados de los oviductos en medio HTF hepes (SAGE Biopharma) e incubados en medio HTF (SAGE Biopharma) previamente incubado a 37°C y equilibrado con 5% de CO₂.

Cultivo in vitro

Se utilizaron embriones de ratón de 2 células y se cultivaron en microgotas de 40µl en medio HTF con 5% HSA (Sage Biopharma) bajo aceite mineral (SIGMA) durante 72 horas a 37°C y con una atmósfera con 5% de CO₂.

Monitoreo de los resultados

Los embriones fueron observados en intervalos de 24 horas. Las observaciones debieron ser rápidas para evitar cambios en el pH y temperatura del medio, ya que estos cambios pueden retardar el desarrollo embrionario (Gerrity, 1988).

El desarrollo de los blastocistos fue clasificado en tres categorías de acuerdo al grado de expansión del blastocele: blastocistos tempranos con un blastocele menor que la mitad del volumen del embrión, blastocistos completamente expandidos con un blastocele mayor que el volumen del embrión y con una zona pelúcida delgada y blastocistos haciendo hatching (saliendo de la zona pelúcida). (Gardner et al.1998)

Evacuación artificial del blastocele de los blastocistos expandidos

A los blastocistos completamente expandidos se les realizó la remoción artificial del blastocele, esto se realizó tanto a los blastocistos que iban a ser criopreservados ya sea por congelamiento lento o por vitrificación; como a aquellos blastocistos que permanecieron en cultivo 24 horas luego de este proceso para evaluar si la evacuación artificial del blastocele produce efectos dañinos en la capacidad de re-expansión de los blastocistos.

Para realizar este procedimiento, se utilizó un microscopio invertido Nikon TM con contraste de fase modulada Hoffman y platina termorregulada a 37°C y micromanipuladores Narishige. Se utilizan micropipetas estériles (Humanen). La micropipeta holding que se utilizó para inmovilizar el blastocisto, tiene un diámetro interno y externo de 100 y 200 μm . La micropipeta de inyección, que se utilizó para pinchar el blastocisto tiene un diámetro interno y externo de 5 y 7 μm .

Alrededor de 10 a 15 minutos antes de la criopreservación, los blastocistos expandidos se colocaron en una gota de 5 μl del medio de inyección (HTF hepes 5% BSA) bajo aceite mineral. Luego de inmovilizar al blastocisto con la micropipeta holding, de tal manera que el macizo celular interno quede ubicado en la posición 12 ó 6, la aguja de inyección debe atravesar la zona pelúcida y el trofooctodermo hasta llegar al blastocele. Luego de retirar la aguja de inyección, la contracción del blastocisto es observada luego de 30 segundos a 2 minutos (ver figura 1).

Congelamiento lento y descongelamiento

Los blastocistos que sufrieron la evacuación artificial del blastocele y otros, que se dejaron intactos como grupo control, se criopreservaron utilizando un protocolo lento que se basa en dos etapas (Ménézo et al., 1992). La criopreservación fue llevada a cabo utilizando glicerol y sacarosa como crioprotectores.

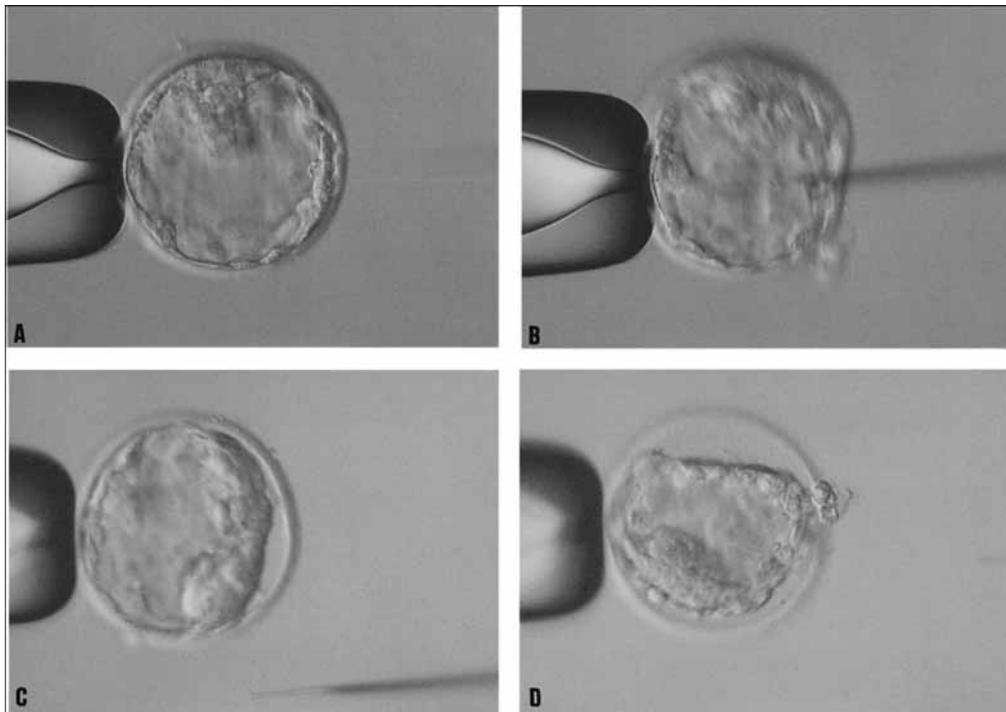


FIGURA 1. Reducción artificial del blastocele: (A) inmovilización del blastocisto con el macizo celular interno a las 12; (B) inserción de la aguja dentro del blastocele; (C) reducción luego de 15 segundos; (D) reducción luego de 1 minuto.

Las soluciones de congelamiento fueron preparadas utilizando HTF hepes (SAGE Biopharma) más 20% de Suero Sintético Sustituto (SSS, Irvine). En la primera etapa del protocolo, los blastocistos fueron incubados en 5% de glicerol durante 10 minutos. Luego, se realizó una segunda incubación durante 10 minutos en una solución que contenía 9% de glicerol y 0,2M de sacarosa. Se cargan las pajuelas y se colocan en posición vertical dentro de la cámara de congelación. El programa de congelación utilizado comienza a una temperatura de 20°C con un descenso lento de 2°C por minuto hasta llegar a -7°C. En esta etapa se realiza el *seeding* que tiene por objeto provocar la nucleación de cristales de hielo en el medio externo de la célula. Luego de 10 min a -7°C, el enfriamiento lento continúa, descendiendo 0,3°C por minuto hasta alcanzar los -30°C y continua el descenso a 1.6°C por minuto hasta alcanzar los -42°C, momento en el cual los blastocistos se almacenan en el nitrógeno líquido.

Las pajuelas conteniendo los blastocistos se descongelaron y rehidrataron siguiendo un protocolo basado en tres etapas. Las pajuelas retiradas del tanque de nitrógeno líquido deben ser mantenidas a temperatura ambiente durante 30 segundos antes de ser colocadas en un baño de agua a 30°C durante 40 segundos. Lentamente se expulsan los blastocistos bajo la lupa en una solución que contiene 0,5M de sacarosa en HTF hepes + 20% de Suero Sintético Sustituto, donde permanecen 10 minutos. Luego se transfieren a una solución 0,2M de sacarosa en HTF hepes + 20% de Suero Sintético Sustituto durante otros 10 minutos y a continuación se transfieren a una solución de lavado que contiene HTF hepes + 20% de Suero Sintético Sustituto

Por último se transfieren los embriones al medio de cultivo HTF previamente calentado a 37°C y gaseado con 5% de CO₂ y se colocan en la incubadora a 37°C. Luego de realizado el descongelamiento de los blastocistos, se evalúa la sobrevida y reexpansión de los mismos luego de 18-20 horas de permanecer en cultivo.

La sobrevida post-descongelamiento de los blastocistos fue observada a las 18-20 horas luego del descongelamiento. Se consideraron blastocistos que sobrevivieron al proceso de congelamiento lento, aquellos blastocistos con el macizo celular interno y el trofoectodermo intactos y con un blastocele re-expandido.

Vitrificación: preparación de las soluciones

Las soluciones que se utilizan durante el proceso de vitrificación fueron preparadas de acuerdo a un protocolo descrito por el Fertility Center of Illinois.

Brevemente, se prepararon dos soluciones, una de equilibración y una de vitrificación. La solución de equilibración (ES), contiene 7.5% de ethylene glycol (EG) y 7.5% de dimethyl sulfoxide (DMSO) en HTF hepes + 20% SSS. La solución de vitrificación (VS) contiene 15% EG, 15% DMSO y 0.5 M Sacarosa en HTF hepes + 20% SSS.

Las soluciones de descongelamiento contienen sacarosa en distintas concentraciones. La primer solución, llamada solución de descongelación (TS) contiene 1.0 M de sacarosa; la segunda solución, llamada solución de dilución (DS), contiene 0,5 M de sacarosa. Como solución de lavado (WS) HTF hepes con 20% de SSS.

Vitrificación de los blastocistos

Un grupo de blastocistos sufrieron la reducción artificial del blastocele. Como grupo control se vitrificaron blastocistos expandidos intactos.

Se utiliza como elemento de almacenaje una hemipajuela (Vendervorst et al., (2001))

El protocolo de vitrificación se detalla en la Figura 2.

Vitrificación: proceso de descongelamiento

Luego de almacenar las pajuelas durante varias semanas, las hemipajuelas se retiran del tanque de nitrógeno y se descongelan siguiendo el protocolo que se detalla en la Figura 3.

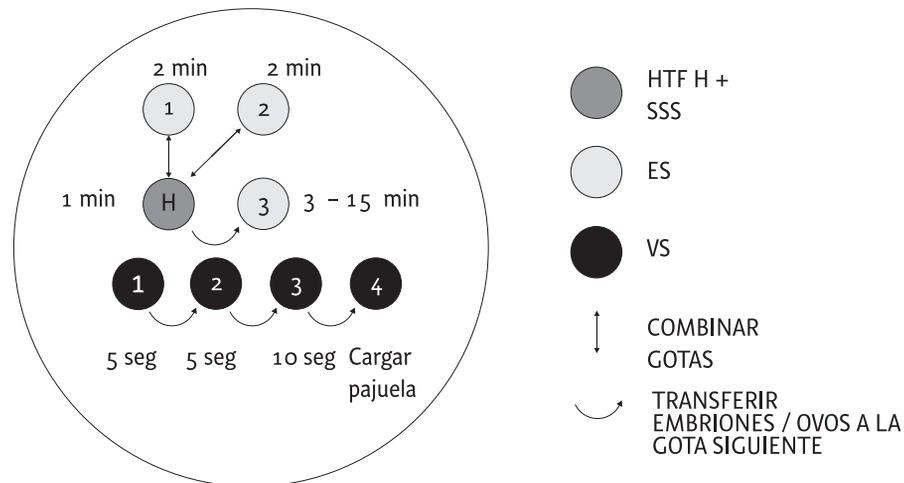


FIGURA 2. Protocolo de vitrificación. Los blastocistos se transfieren a los distintos medios según indica la figura. Los embriones se depositan en la pajuela con 1 μ l de medio. La hemipajuela es sumergida de forma vertical en el nitrógeno líquido. Las hemipajuelas son colocadas en los crioviales y almacenadas en los tanques de nitrógeno.

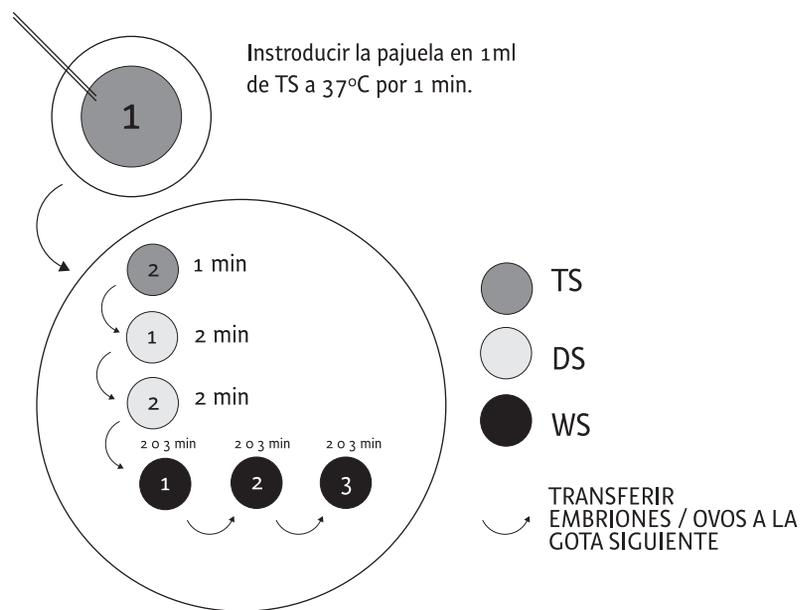


FIGURA 3. Protocolo de descongelamiento. Se retira la hemi-pajuela del tanque de nitrógeno e inmediatamente se introduce en 1 ml de medio TS a 37°C. Luego se transfieren los blastocistos a los distintos medios según indica la figura. Los blastocistos se incuban en el medio de cultivo en la incubadora a 37°C con 5% de CO₂.

La sobrevida post-descongelamiento de los blastocistos fue observada a las 18-20 horas luego del descongelamiento. Se consideraron blastocistos que sobrevivieron al proceso de vitrificación, aquellos blastocistos con el macizo celular interno y el trofooctodermo intactos y con un blastocele re-expandido.

Análisis estadístico

El porcentaje de blastocistos expandidos habiendo sufrido o no la evacuación artificial del blastocele y congelados por la técnica tradicional de congelamiento lento o por vitrificación fue comparado utilizando el Test Exacto de Fisher. $P < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Resultados

Se determina la sobrevida post-descongelamiento de los embriones en estadio de blastocisto que fueron criopreservados por el método convencional de congelamiento lento o por el método de la vitrificación; y habiendo o no sufrido previamente la remoción artificial del blastocele.

De los 342 embriones de ratón en dos células que se cultivaron durante 72 hs en el medio de cultivo HTF, 274 se desarrollaron hasta alcanzar el estadio de blastocisto (80%). De aquellos embriones, 139 se encontraban completamente expandidos por lo estos fueron los que se utilizaron para realizar el vaciado artificial del blastocele y la criopreservación. El resto de los blastocistos se encontraba haciendo hatching o no habían alcanzado el nivel de desarrollo deseado por lo que no fueron utilizados en el trabajo.

En la tabla 1 se muestra la cantidad de blastocistos utilizada en los distintos grupos de estudio. De los 86 blastocistos a los que se les realizó la remoción artificial del blastocele, 36 permanecieron en cultivo durante 24 horas para evaluar la capacidad de desarrollo de los embriones luego de realizado este proceso, descartando un posible daño producido por haber removido de forma artificial el blastocele; el resto fue criopreservado por el método convencional de congelamiento lento y por vitrificación. Como grupo control, 53 blastocistos fueron criopreservados por los dos métodos antes mencionados, sin haberles realizado previamente la remoción artificial del blastocele.

La tabla 2 muestra el efecto de la remoción artificial del blastocele en el desarrollo in vitro de los blastocistos que no fueron criopreservados. De acuerdo a los resultados obtenidos, no se ha observado ningún efecto dañino luego de realizado este proceso (FIG. 4). A 36 blastocistos se les realizó la remoción artificial del blastocele, en lugar de ser criopreservados, para evaluar su capacidad de desarrollo luego de este proceso. El 100% (36) de los blastocistos volvieron a re-expandirse luego de permanecer 24 horas en cultivo, 22 de estos blastocistos hicieron hatching a las 18 horas.

La tasa de sobrevida de los blastocistos luego de la criopreservación está resumida en la tabla 3. La sobrevida post-descongelamiento de los blastocistos fue observada a las 18-20 horas luego del descongelamiento.

Un total de 67 blastocistos fueron criopreservados por el método convencional de congelamiento lento, a 34 blastocistos se les realizó previo a la criopreservación, la remoción artificial del blastocele y 33 blastocistos se utilizaron como grupo control y fueron criopreservados completamente expandidos. Al comparar la tasa de re-expansión de los blastocistos 24 horas post-descongelamiento, se ha observado una mayor tasa de sobrevida en aquellos blastocistos a los que se les realizó la remoción artificial de blastocele previo a la criopreservación. El 9% de los blastocistos se re-expandió en el grupo control y un 39% en el grupo que sufrió la reducción artificial

Blast. Remoción Artificial del blastocele			Blast. Control	
86			53	
34		36	33	20
Congelamiento lento	16 Vitrificación	Cultivo 24 horas	Congelamiento lento	Vitrificación

TABLA 1. Cantidad de blastocistos en cada grupo de estudio.

Nº de blastocistos Remoción Artificial del blastocele	36
Nº de blastocistos re-expandidos 24 hs.	36 (100%)

TABLA 2. Grupo control: embriones con blastocele evacuado incubados por 24 hs

del blastocele; observando una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

Un total de 36 blastocistos fueron vitrificados, a 16 blastocistos se les realizó previo a la vitrificación, la remoción artificial del blastocele y 20 blastocistos se utilizaron como grupo control y fueron vitrificados completamente expandidos. Veinticuatro horas después del descongelamiento, el 73% de los blastocistos del grupo control y el 75% de los blastocistos que sufrieron la remoción artificial de blastocele previo a la vitrificación, se reexpandieron tras permanecer 24 horas en cultivo luego del descongelamiento. Podemos observar que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de sobrevivencia de los dos grupos de estudio de blastocistos vitrificados.

Discusión

La criopreservación se ha convertido en una parte importante en los procedimientos de RA. Ofrece la ventaja de reducir el riesgo de embarazos múltiples mientras que aumenta el número de

transferencias por ciclo de estimulación, aumentando las probabilidades de obtener, como resultado final, un embarazo.

Dos técnicas básicas se desarrollaron para criopreservar embriones de mamíferos: “congelamiento controlado lento” y “vitrificación”.

Con el objeto de disminuir el número de embriones a transferir y criopreservar, se decidió utilizar el cultivo extendido de embriones al estadio de blastocisto. Se ha reportado que blastocistos producidos en co-cultivo con células vero, se criopreservaron en forma exitosa usando las técnicas clásicas de congelamiento lento, utilizando como crioprotector glicerol (Kaufman et al 1995). En nuestra experiencia, no ha dado buenos resultados, aplicando el protocolo de congelamiento lento en blastocistos de día 5-6 de buena calidad, obtenidos por cultivo en medios secuenciales. Estos pobres resultados fueron confirmados por otros grupos (Ludwig et al 1999., Plachot et al 2000.) quienes también observaron una baja eficiencia al descongelar blastocistos criopreservados luego de cultivar en medios secuenciales.

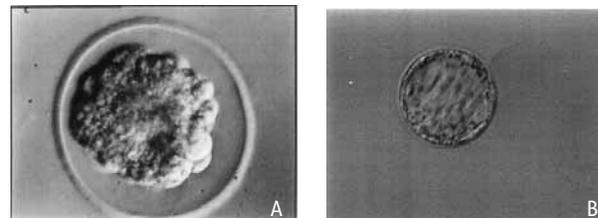


FIGURA 4: A: Blastocisto al que se le realizó la remoción artificial del blastocele. B: Blastocisto al que se le realizó la remoción artificial del blastocele y que permaneció 24 horas en cultivo para evaluar la reexpansión.

	Blast. control	Blast. remoción artificial del blastocele
Nº de blast. cong. lento	33	34
Nº de blast. re-expandidos	3 (9)	13 (39)*
Nº de blast no expandidos	30 (91)	21 (61)*
Nº de blast. vitrificados	20	16
Nº de blast. re-expandidos	13 (73)	11 (75)
Nº de blast no expandidos	6 (30)	4 (25)

TABLA 3. Tasa de sobrevivencia de los blastocistos luego de la criopreservación. Los valores entre paréntesis son porcentajes. Comparación realizada por Test de Fisher. *p < 0.05

Analizando esta diferencia de sobrevivencia según el estadio del embrión utilizando el mismo método de criopreservación, aparecen dos factores de importancia a considerar: 1) los diferentes volúmenes de las células entre los estadios tempranos y los blastocistos y 2) la presencia de la cavidad blastocélica.

Si nosotros consideramos el volumen de los blastómeros de un embrión temprano y un blastocisto, podríamos esperar una mejor prevención de la formación de cristales en el estado más avanzado, dado que el crioprotector a la concentración usada, entraría más rápido a las células beneficiando el congelamiento. Pequeños blastómeros son menos sensibles al estrés osmótico y consecuentemente se produciría menor injuria osmótica al producirse la remoción del crioprotector (Tachikawa et al).

El otro factor que puede afectar la tasa de sobrevivencia de los blastocistos consiste en la cavidad llena de líquido (blastocelo) que este posee. Se sugiere que una insuficiente penetración del crioprotector dentro de la cavidad blastocélica podría causar formación de cristales de hielo durante los pasos de congelamiento, reduciendo la sobrevivencia post-descongelamiento.

En este trabajo, en primer lugar, examinamos la tasa de sobrevivencia de los blastocistos de ratón criopreservados por dos métodos: congelamiento lento y vitrificación. En segundo lugar estudiamos el efecto que produce, en dicha tasa de sobrevivencia, la remoción artificial del blastocelo previo a la criopreservación.

Nuestros resultados demuestran que blastocistos expandidos de ratón criopreservados con el sistema convencional lento, aumentan su sobrevivencia post-descongelamiento si su cavidad blastocélica es vaciada mecánicamente antes de congelar (39% vs. 9%).

La reducción artificial del fluido del blastocelo por punción del trofooctodermo con una aguja de vidrio, no afecta la viabilidad del blastocisto por si misma, como

se demostró con aquellos embriones vaciados y cultivados in vitro durante 24 hs.

Sugerimos que el fluido del blastocelo al formar cristales de hielo produciría un daño mecánico irreversible al embrión. El vaciamiento del blastocelo tendría entonces como objeto reducir el efecto negativo que este tienen cuando se congelan los blastocistos con el método convencional.

En lo que respecta al segundo método de criopreservación; la vitrificación, fue menos dañina como método de congelación para los blastocistos murinos utilizando como crioprotector etilenglicol. Esto podría deberse a mecanismos relativos a la penetración de los crioprotectores, al grado de deshidratación durante el agregado de las soluciones crioprotectoras que evitarían la posterior formación de cristales de hielo que finalmente injurien a las células líquido (Rall et al 1985-1987). (Choi et al .2000)

Nuestros resultados muestran un incremento en la tasa de sobrevivencia y posterior desarrollo embrionario con este método, pero no encontramos diferencias significativas en las tasas de sobrevivencia al utilizar la vitrificación como método de criopreservación cuando se vacía el blastocelo mecánicamente (73% vs. 75%).

En nuestro protocolo de vitrificación damos importancia a los tiempos de incubación, la utilización de pequeños volúmenes de trabajo, el tipo de pajueta utilizada para el almacenamiento de los embriones y el rápido enfriamiento. Esto permite que la penetración del crioprotector sea suficiente, permitiendo la formación del estado interno amorfo (vítreo) que impide el desarrollo de cristales. Esta penetración se logra trabajando con volúmenes mínimos de solución que incrementan el contacto entre la solución crioprotectora y el nitrógeno

En conclusión:

La vitrificación utilizando un método de muy rápido enfriamiento y bajos volúmenes que aumenten el contacto criopro-

tector-nitrógeno, es un mejor método para criopreservar blastocistos que el congelamiento convencional lento.

La liberación mecánica del líquido del blastocele no mejora la tasa de sobrevivencia de los embriones vitrificados con un método de enfriamiento extremadamente rápido. La liberación mecánica del líquido del blastocele mejora la tasa de sobrevivencia de los embriones congelados por el método convencional lento, pues permite una mejor penetración del crioprotector y disminuye la formación de cristales de hielo que producen injurias y muerte embrionaria.

Bibliografía

1. Chen S. U., Lien Y.R., Chen H.F. et al. (2000a). **Open pull straw for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws.** *Hum Reprod.* **15**, 2598-2603.
2. Chen S.U., Lien Y.L., Chao K.H. et al. (2000b). **Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws.** *Fertil Steril*, **74**, 804-808.
3. Choi, D., Chung, H., Lim, J., Ko, J., Yoon, Y. and Cha, K. (2000) **Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program.** *Fertil. Steril.*, **74**, 838-839.
4. Fahy G., MacFarlane D., Angell C. and Meryman H. (1984). **Vitrification as an approach to cryopreservation.** *Cryobiology*. **21**. 407-426.
5. Gardner, D., Schoolcraft, W., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J. and Hesla, J. (1998) **A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization.** *Hum. Reprod.*, **13**, 3434-3440.
6. Hamawaki, D., Kuwayama, M. and Hamano, S. (1999) **Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification.** *Theriogenology*, **43**, 141-152.
7. Kaufman R.A., Ménézo Y., Hazout A. et al. (1995) **Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles.** *Fertil Steril*, **64**, 1125-1129.
8. Kuleshova L. and Lopata A. (2002) **Vitrification can be more favourable than slow cooling.** *Fertil Steril*, **78**, 449-454.
9. Kuwayama, M., Hamano, S. and Nagai, T. (1992) **Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro.** *J. Reprod. Fertil.*, **96**, 187-193
10. Lane, M., Schoolcraft, W. and Gardner, D. (1999) **Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop containerless technique.** *Fertil. Steril.*, **72**, 1073-1078.
11. Ludwig M., Al-Hasani S., Felderbaum R. and Diedrich K. (1999). **New aspect of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and future perspectives.** *Hum Reprod.* **14** (Suppl 1), 162-185.
12. Menezo Y., Hazout A., Dumont M. et al. (1992) **Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans.** *Hum Reprod.* **7**, (Suppl.1), 101-106.
13. Menezo Y., Nicollet B., Herbaut N., Andre D. (1992) **Freezing cocultured human blastocysts.** *Fertil Steril.* **58**, 460-465.
14. Planchot M., Belaisch-Allart J., Mayenga J.M., Chouraqui A., Serkine A. and Tesquier L. (2000). **Blastocyst stage transfer: the real benefits compared with early embryo transfer.** *Hum Reprod.* **14** (Suppl 6). 24-30.
15. Rall W. (1987). **Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification.** *Cryobiology* **24**. 387-402.
16. Rall W., and Fahy G. (1985). **Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification.** *Nature* **313**. 573
17. Son W.Y., Yoon S.H., Yoon H.J. Lee S.M. and Lim J.H. (2003). **Pregnancy outcome following transfer of human blastocyst vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocele.** *Hum Reprod.* **18**, 137-139.
18. Tachikawa, S., Otoi, T., Kondo, S., Machida, T. and Kasai, M. (1993) **Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization.** *Mol. Reprod. Dev.*, **34**, 266-271.
19. Vanderzwalment P., Bertin G., Debauche Ch., Standaert V., van Roosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zech H., Mukaida T., Takahashi K., Schoysman R. (2002).



CENTRO DE ESTUDIOS EN GINECOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN
Institución afiliada a la Facultad de Medicina
de la Universidad de Bs. As.

Director Médico
Dr. Sergio Papier

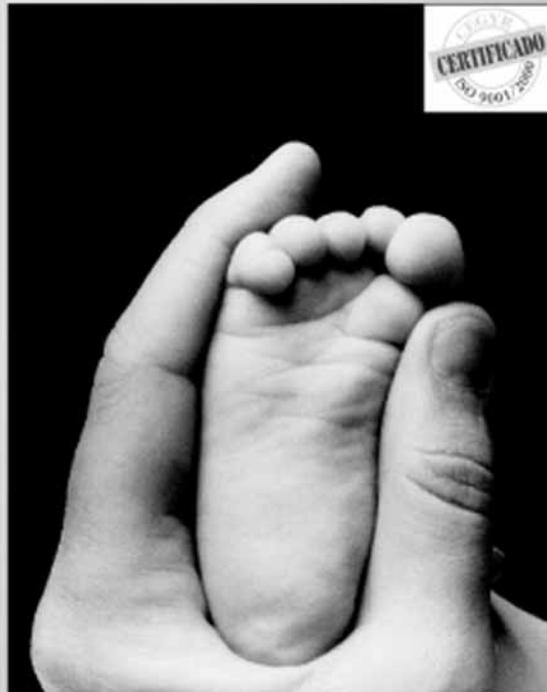
Sub Director Médico
Dra. Susana Kopelman

Consultor Médico
Dr. Claudio Chillik

Director Científico
Dr. Carlos Sueldo

Directores Asociados
Dr. Mario Borghi
Dr. Gabriel Fiszbajn
Lic. Florencia Nodar

Profesionales Asociados
Dr. Mariano Baronio
Dr. Juan Calamera
Dr. Jorge Hamer
Dr. Luis Uktveris



Institución Pionera en Medicina Reproductiva

Viamonte 1438 (1055), Buenos Aires, Argentina
Tel: (54-11) 4372 - 8289 - Fax: (54-11) 4371 - 7275
E-mail: cegyr@cegyr.com
Home Page: www.cegyr.com

Ciudad de Buenos Aires

Centro de Reproducción Hospital Italiano



**Diagnóstico y tratamiento
de la pareja estéril.
Endoscopía en reproducción.
Fertilización asistida de alta y
baja complejidad.
Aborto habitual.**

Jefe de Servicio: Dr. Roberto Testa
Jefe de Sección Reproducción: Dr. Sebastián Gogorza

Gascón 450 – Capital
Tel-Fax: (054) 4958-4546
gineco@hospitalitaliano.org.ar