

Sobrevida de blastocistos post-eclosión asistida para diagnóstico preimplantación (PGD) que fueron vitrificados y desvitrificados. A propósito de un caso

Alberto Valcarcel,¹ Gabriel Dalvit,² Marisa Tiveron,¹ Mercedes Grünwaldt,¹ Mercedes Guidobono,¹ Martín Vilela,¹ Germán Van Thillo,¹ Guillermo Marconi,¹ Edgardo Young¹

¹ Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER)

² Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA

Reproducción 2009;24:10-19

Resumen

La técnica de diagnóstico genético preimplantación está ampliamente difundida en los laboratorios de reproducción asistida. Con el advenimiento de la técnica de vitrificación, ésta comenzó a ser una alternativa valedera al congelamiento lento. Se han desarrollado distintos tipos de contenedores en donde colocar los embriones que serán vitrificados, todos ellos con distintas características y resultados. En nuestro caso, utilizamos la vitrificación de blastocistos que habían sido biopsiados en día 3 de desarrollo en un programa de PGD y que resultaron ser portadores de monosomías/anomalías complejas letales como herramienta para evaluar la competencia y sobrevida posterior a la desvitrificación de este tipo de blastocistos para ser implementada en forma clínica. En este trabajo se utilizaron embriones de una paciente que realizó PGD. Se capturaron 17 oocitos con una tasa de fertilización de 76% (13/17). Desarrollaron los 13 embriones hasta día 3. De ellos, 9 embriones resultaron de excelente/muy buena calidad, 3 embriones de regular calidad y 1 embrión de mala calidad. Se realizó PGD en 12 embriones en día 3 de desarrollo. Del total de embriones producidos, 2 de ellos resultaron ser normales y fueron transferidos y los 10 restantes presentaron distintos tipos de anormalidades cromosómicas. Todos los embriones anormales fueron cultivados hasta día 5. Siete de ellos progresaron hasta blastocisto

temprano,¹ blastocistos con distinto grado de expansión⁵ y blastocisto eclosionando.¹ Estos embriones biopsiados fueron vitrificados y desvitrificados. Los 3 embriones anormales restantes detuvieron su desarrollo. Luego de ser desvitrificados, se recuperaron los 7 embriones biopsiados (tasa de recuperación: 100%). Una vez desvitrificados, los blastocistos biopsiados fueron cultivados durante 24 horas para evaluar la vitalidad de los mismos, siendo evaluados inmediatamente después de desvitrificados, a tiempo 1 hora, a tiempo 4 horas y a tiempo 24 horas post-desvitrificación. Los 7 blastocistos luego de 24 horas de cultivo mostraron signos indudables de vitalidad, lográndose en dos de ellos expansión del blastocelo, que 2 de ellos empezaran a hacer eclosión y que 3 hicieran eclosión completa, lo que representa el mejor indicador de la vitalidad de los blastocistos biopsiados vitrificados/desvitrificados. Nuestros resultados, si bien preliminares y haciendo la salvedad de tratarse del reporte de un único caso, demuestran que blastocistos con ZP abierta que fueron vitrificados/desvitrificados pueden ser recuperados eficientemente y que su vitalidad no se ve afectada al menos en la mayor parte de ellos. El desarrollo de una técnica de criopreservación eficiente de blastocistos que fueron previamente biopsiados tiene una incidencia directa en los programas de PGD, ya que representa la oportunidad de utilizar efectivamente embriones normales que no fueron transferidos en fresco. En función de los resultados presentados en este trabajo se procederá a la implementación clínica de esta técnica en nuestro programa de diagnóstico genético preimplantación.

Correspondencia: Alberto Valcarcel
E-mail: avalcarcel@hotmail.com

Palabras claves: vitrificación, blastocisto con zona pelúcida abierta, diagnóstico genético preimplantación.

Blastocyst survival post assisted hatching for preimplantation genetic diagnosis (PGD) vitrified and unvitrified. About a case

Summary

Preimplantational genetic diagnosis (PGD) has become a widely applied tool in assisted reproduction laboratories. Vitrification is today a valid alternative to the classic slow freezing technique. Different types of containers have been developed where to place the embryos being vitrified, all of them with different characteristics and results. In our case we worked with blastocysts that had been biopsied in day 3 for PGD and ended being carriers of complex chromosomal anomalies or lethal monosomies/trisomies in order to evaluate the competence and survival after thawing of these previously vitrified blastocysts with the idea of future clinical applications. As mentioned above, embryos biopsied for PGD from a single patient were used. Seventeen oocytes were recovered, and a fertilization rate of 76% was obtained (13/17). The 13 embryos reached the third day. Nine of them were of excellent or good quality, 3 of regular quality and 1 was of poor quality. The best 12 embryos were biopsied in the third day. Two of the embryos were chromosomally normal and transferred and 10 showed different types of chromosomal abnormalities, none of them viable. Seven of these embryos evolved to different degrees, either early blastocyst,¹ different grades of expansion⁵ and hatching stage¹. These embryos were the subject of the study and were hence vitrified and thawed. The remaining 3 embryos did not progress further. After thawing, the 7 embryos were recovered intact (100% recovery rate). These were further cultured for an additional 24 hs to evaluate vitality and potential, being evaluated at 1, 4 and 24 hours after thawing. After 24 hs the 7 blastocysts showed undoubtfull signs of vitality, achieving 2 of them expansion of the blastocoele, 2 of them started the hatching process, and 3 completed hatching: this representing the best vitality and potential indicator of vitrified/thawed embryos. These results, although preliminary; and considering this is just a single case report, show that blastocysts even with the drilled zona pellucida and biopsied can be safely recovered

after vitrification/ desvitrification process. The development of an efficient technique of cryopreservation for blastocysts resulting from previously biopsied embryos, has a direct impact in PGD programs, rising the opportunity of efficiently maximizing results allowing to utilize chromosomally normal embryos not transferred in the fresh cycle. Based on this preliminary results this technique will be further investigated and clinically implemented in our PGD program.

Key words: Vitrification, blastocyst with zona pelúcida drilled, preimplantational genetic diagnosis.

Introducción

El cultivo de embriones humanos hasta el estadio de blastocisto está ampliamente difundido y es una alternativa ofrecida en la mayoría de los centros de reproducción asistida de todo el mundo. Tiene la ventaja de tratarse de un proceso que permite una mejor evaluación de la potencialidad implantatoria y paralelamente una reducción del número de embriones a transferir en fresco, así como también la cantidad de embriones supernumerarios para criopreservar (Jones y col 1998, Plachot y col 2000, Karaki y col 2002, Wilson y col 2002, Blake y col 2007).

La técnica de diagnóstico genético preimplantación (PGD, en inglés) está ampliamente difundida en los laboratorios de reproducción asistida para la selección de los embriones cromosómicamente normales que serán transferidos en pacientes con distintas etiologías (Munné y col 2000 y 2003, Munné 2001, 2002 y 2003, Gianaroli y col 2002, Simopoulou 2003, Aran y col 2004, Kahraman y col 2004, Caglar y col 2005, Rubio y col 2005, Pagidas y col 2008).

La criopreservación de blastocistos humanos por medio de protocolos de congelamiento lento es una técnica con resultados variables, aunque durante muchos años resultó ser la técnica más difundida para este tipo de embriones (Menezo y col 1992 y 1993, Behr y col 2002, Gardner y col 2003, Kosasa y col 2005, Stehlik y col 2005, Youssry y col 2008). Con el advenimiento de la técnica de vitrificación, ésta comenzó a ser una alternativa valedera al congelamiento lento y sus resultados tanto en sobrevida como tasa de embarazo posterior al descongelamiento resultaron ser

superiores (Yokota y col 2000 y 2001, Mukaida y col 2001 y 2003, Lieberman y col 2002 a y b, 2003, Vanderzwalmen y col 2002 y 2003, Liebermann y Tucker, 2004).

La vitrificación, definida como una elevación extrema de la viscosidad (Lieberman y col 2002a, Fuller y Paynter 2004, Kasai y Mukaida, 2004, Lieberman y Tucker 2004), puede ser inducida tanto por la utilización de altas concentraciones de soluciones crioprotectoras como por el uso de un gradiente muy alto de temperatura. Debido a los efectos tóxicos de los crioprotectores que se manifiestan en la capacidad de desarrollo de los embriones, los mayores esfuerzos en la vitrificación han sido focalizados en el aumento de las tasas de enfriamiento.

A la fecha se han desarrollado distintos tipos de contenedores en donde colocar los embriones que serán vitrificados, todos ellos con distintas características y resultados (Lane y col 1999, Choi y col 2000, Mukaida y col 2001 y 2003, Son y col 2002 y 2003, Kuwayama y col 2005, Vajta y Nagy 2006, Youssry y col 2008).

En nuestro caso, utilizamos la vitrificación de blastocistos que habían sido biopsiados en día 3 de desarrollo en un programa de PGD y que resultaron ser portadores de monosomías/anomalías complejas letales como herramienta para evaluar la competencia y sobrevida posterior a la desvitrificación de este tipo de blastocistos para ser implementada en forma clínica.

Material y métodos

Estimulación ovárica

Los oocitos frescos fueron obtenidos siguiendo una hiperestimulación ovárica controlada usando un protocolo largo con análogos de GnRH (*Lupron 2.8 ml, Laboratorio Abbott, Buenos Aires, Argentina*) 0,1 ml/día sc hasta la menstruación y 0,05 ml/día sc hasta la aplicación del hCG-r (*Ovidrel, Laboratorio Merck Serono, Buenos Aires, Argentina*). La hiperestimulación ovárica fue realizada utilizando FSH recombinante (*Gonal-F, Laboratorio Merck Serono, Buenos Aires, Argentina*) a razón de 225 UI/día y ajustando las dosis según respuesta. El desarrollo folicular fue monitoreado por vía ultrasonográfica ovárica y evaluación de estradiol sérico. Cuando al menos 2 folí-

culos tuvieron un diámetro mayor a 18 mm, los pacientes recibieron 10000 IU de hCG-r.

La aspiración folicular transvaginal para la captación oocitaria fue realizada 36 hs después de la inyección de hCG.

Manejo de los oocitos

Una vez que fueron identificados los complejos oocito-cumulus oophorus fueron separados inmediatamente del fluido folicular, lavados y transferidos a un medio sintético (*Human Tubal Fluid modified, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EEUU*) suplementado al 3% con albúmina sérica humana (*Human Serum Albumin, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EEUU*), (HTFm+HSA). Una vez concluida la captación oocitaria, los complejos oocito-cumulus fueron transferidos a una cápsulas de 4 pozos que contenía 0,5 ml de medio G-IVF PLUS (*Vitrolife, Kungsbacka, Suecia*) y fueron cultivados en estufa a 6% CO₂ y 37°C durante 4 horas.

Procesamiento de la muestra de semen e inseminación

La muestra de semen fue procesada a través de un gradiente de densidad discontinuo 90-50% (*SpermGrad, Vitrolife, Kungsbacka, Suecia*) seguido por dos lavados en HTFm+HSA. La suspensión final de espermatozoides fue dejada a temperatura ambiente hasta el momento de la inseminación.

Cuatro horas después de la captación oocitaria se procedió a la remoción completa de las células del cumulus y la corona por exposición a hialuronidasa (80 UI/ml), (*Sigma Chemical, St. Louis, MO, EEUU*), y posterior manipulación mecánica con pipetas de vidrio finas. El procedimiento de Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides fue realizado según protocolo estandarizado (Van Steirteghem y col 1993).

Evaluación de fecundación y desarrollo embrionario

Diez y siete horas pasado el momento de la inseminación, los oocitos fueron cuidadosamente inspeccionados para observar la presencia de dos pronúcleos (indicador de fecundación normal) en un microscopio invertido (*Nikon Inverted Microscope Diaphot 300, Nikon Corporation, Tokio, Japón*).

Las cigotas producidas fueron cultivadas en grupos de hasta 4 en el interior de cápsulas de 4 pozos que contenían G1.5 PLUS (*Vitrolife*, Kungsbacka, Suecia) hasta día 3 de desarrollo.

Los embriones desarrollados fueron biopsiados y luego de la biopsia de blastómeras fueron trasladados a cápsulas nuevas que contenían G2.5 PLUS (*Vitrolife*, Kungsbacka, Suecia) fresco hasta el día 5 de desarrollo, siendo cultivados a partir de ese momento cada uno de ellos en cápsulas individuales para su identificación. Todo el desarrollo se realizó en incubadora en condiciones estándares (37°C, 6% CO₂).

Extracción de blastómeras y diagnóstico preimplantación

La biopsia de blastómera fue realizada en embriones en día 3 de desarrollo. Para ello los embriones fueron colocados en gotas de un medio libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (G-PGD, *Vitrolife*, Kungsbacka, Suecia) y la zona pelúcida fue perforada utilizando una solución acidificada de Tyrode [Tyrode's *Solution Acidief* (pH 2.1-2.5), *Irvine Scientific*, Santa Ana, CA, EEUU]. Se extrajeron 2 blastómeras de cada embrión por aspiración utilizando una pipeta diseñada para tal efecto (*MBB-FP-M-30*, *Humagen*, Charlottesville, VA, EEUU) y fijadas individualmente con metanol ácido acético (3:1) en un microscopio invertido, utilizando un protocolo sin pretratamiento hipotónico. El ensayo de anormalidades cromosómicas fue realizado por la técnica de FISH.

La técnica de FISH fue realizada en el Centro Consultor en Patología Perinatal y Pediátrica de la Dra Rosa Mónica Drut en la ciudad de La Plata, Provincia de Buenos Aires. Para ello fueron utilizadas sondas centroméricas (*Vysis INC. Downers Grove*, IL, EEUU), analizándose los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en dos blastómeras para cada embrión.

Vitrificación

La vitrificación de los blastocistos biopsiados que resultaron anormales fue realizada utilizando el método descrito por Kuwayama y col (2005) que utiliza como contenedor un *Cyotop* (*Kitazato BioPharma Co*, Shizuoka, Japon).

Para ello en una placa de Petri estéril se colocaron: 2 ml de solución equilibrante (*ES*, *Code*

VT101, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co, Shizuoka, Japon). Luego se transfirió un blastocisto biopsiado con el mínimo volumen posible del medio G2.5 PLUS de la incubadora en la que se encontraba desarrollándose a la cápsula con el medio equilibrante durante 15 minutos como máximo. Cumplido este tiempo, el blastocisto fue transferido a una cápsula que contenía 2 ml de la solución de vitrificación (*VS*, *Code VT101, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co*, Shizuoka, Japon) durante 60 segundos como máximo y finalmente se lo cargó en el *Cryotop*, retirándose el exceso de solución de vitrificación por el uso de pipeta. Se recubrió el *Cryotop* con el cobertor y se procedió a sumergir el *Cryotop* completo en nitrógeno líquido, lográndose una tasa de enfriamiento de aproximadamente -12000 °C/min.

Desvitrificación

Para la desvitrificación el *Cryotop* fue retirado del nitrógeno líquido e inmediatamente colocado en una cápsula de Petri chica conteniendo 2ml de una solución de descongelación (*TS*, *Code VT102, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co*, Shizuoka, Japon) a 37°C durante 1 minuto. Luego el blastocisto biopsiado fue transferido a otra placa conteniendo una Solución de Dilución (DS) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el blastocisto fue colocado en dos soluciones de lavado sucesivas, denominadas WS1 (*Code VT102, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co*, Shizuoka, Japon) y WS2 (*Code VT102, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co*, Shizuoka, Japon), durante 5 minutos en cada una de ellas, estando la primera a temperatura ambiente y la segunda a 37°C.

Finalizados los lavados, el blastocisto fue transferido a una cápsula de 4 pozos que contenía 0,5 ml de medio G2.5 PLUS.

Cultivo de blastocistos desvitrificados

Una vez desvitrificados, los blastocistos biopsiados fueron cultivados durante 24 horas en medio G2.5 PLUS para evaluar la vitalidad de los mismos, siendo evaluados inmediatamente después de desvitrificados (tiempo= 0 horas), a tiempo 1 hora, a tiempo 4 horas y a tiempo 24 horas post-desvitrificación.

Pacientes

En este trabajo se utilizaron embriones de una paciente de 35 años que realizó PGD en el IFER y que tenía como diagnóstico 4 abortos consecutivos. Ambos miembros de la pareja poseían un cariotipo normal.

Se captaron 17 oocitos con una tasa de fertilización de 76% (13/17). Desarrollaron los 13 embriones hasta día 3. De ellos, 9 embriones resultaron de excelente/muy buena calidad, 3 embriones de regular calidad y 1 embrión de mala calidad. Se realizó PGD en 12 embriones en día 3 de desarrollo. Del total de embriones producidos, 2 de ellos resultaron ser normales y fueron transferidos y los 10 restantes presentaron distintos tipos de anomalías cromosómicas.

Los pacientes firmaron los consentimientos para la utilización de los embriones que resultaron anormales en este trabajo.

Resultados

Todos los embriones anormales fueron cultivados hasta día 5, y 7 de ellos progresaron hasta:

- * 1 Blastocisto temprano (embrión N° 8)
- * 5 Blastocistos con distintos grados de expansión (embriones N° 1, 2, 3, 4, 12)
- * 1 Blastocisto eclosionando (Embrión N° 5)

Los 3 embriones anormales restantes detuvieron su desarrollo.

Estos 7 embriones que progresaron resultaron ser:

- * 2 con monosomía del cromosoma 13 (Embriones N°1 y 8).
- * 1 con monosomía del cromosoma 13 y monosomía del cromosoma 18 (Embrión N°2).
- * 2 con monosomía del cromosoma 18 (Embriones N° 3 y 12).
- * 1 con monosomía del cromosoma 21 y trisomía del cromosoma 13 (Embrión N°4).
- * 1 con monosomía del cromosoma 21 (Embrión N° 5).

Estos embriones biopsiados fueron vitrificados y desvitrificados.

La Figura 1 muestra las fotografías de los embriones antes de ser vitrificados.

La Figura 2 muestra los blastocistos biopsiados inmediatamente después de ser desvitrificados (tiempo= 0 horas). Como puede observarse la mayor parte de ellos ha sufrido una marcada reducción de su cavidad blastocélica. Uno de ellos

ha perdido su zona pelúcida en el proceso de vitrificación/desvitrificación (embrión N° 5) y otro se encuentra realizando la eclosión de la zona pelúcida (embrión N° 4).

Figura 1. Blastocistos biopsiados antes de ser vitrificados. Los números indican el número del embrión correspondiente. Luego de ser desvitrificados, se recuperaron los 7 embriones biopsiados (tasa de recuperación: 100%).

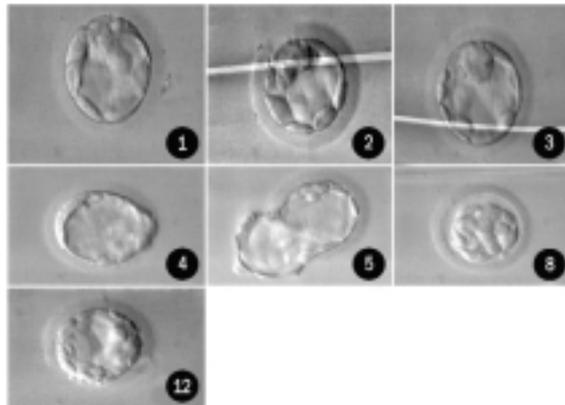
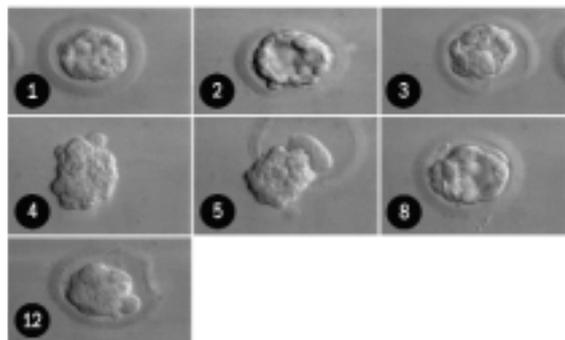


Figura 2. Blastocistos inmediatamente después de ser desvitrificados. Los números a la izquierda indican el número del embrión correspondiente.



La Figura 3 muestra los blastocistos biopsiados 1 hora después de ser desvitrificados. En ella puede verse claramente cómo los blastocistos empiezan a recuperar lentamente su cavidad blastocélica, aún aquellos que han eclosionado.

La Figura 4 muestra los blastocistos biopsiados 4 horas después de ser desvitrificados. Todos los blastocistos a excepción de uno (embrión N° 12) continúan incrementando su cavidad blastocélica.

Figura 3. Blastocistos biopsiados 1 hora post-desvitrificación. Los números indican el número del embrión correspondiente.

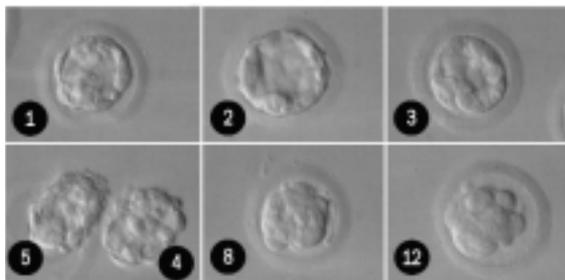
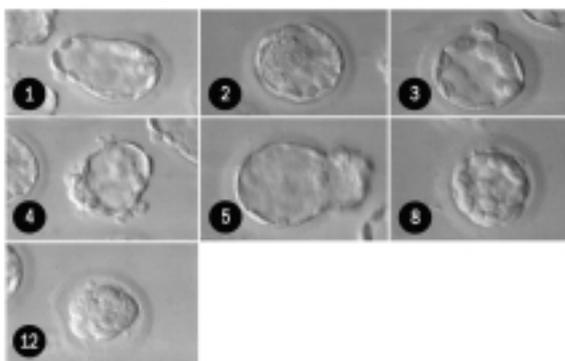
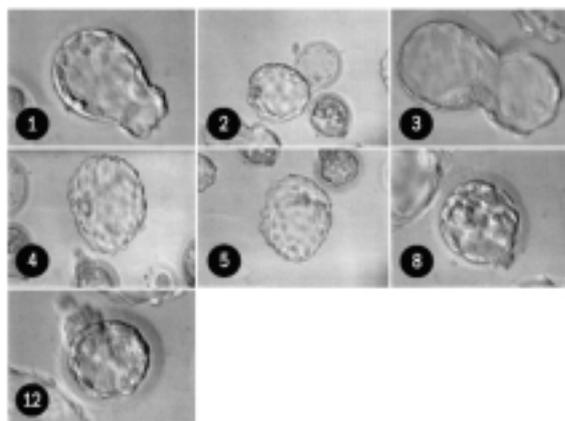


Figura 4. Blastocistos biopsiados 4 horas post-desvitrificación. Los números indican el número del embrión correspondiente.



La Figura 5 muestra los blastocistos biopsiados 24 horas después de ser desvitrificados. Todos los blastocistos continuaron incrementando su cavidad blastocélica, lo que representa el mejor indi-

Figura 5. Blastocistos biopsiados 24 horas post-desvitrificación. Los números indican el número del embrión correspondiente.



cador de la vitalidad de los blastocistos biopsiados vitrificados/desvitrificados.

De esta manera, los 7 blastocistos previamente biopsiados luego de 24 horas de cultivo mostraron signos indudables de vitalidad, lográndose en 2 de ellos expansión del blastocele, que 2 de ellos empezaran a hacer eclosión y que 3 hicieran eclosión completa.

Discusión

Inicialmente en los programas de PGD los embriones eran criopreservados en día 3 de desarrollo luego de haber sido biopsiados. A pesar de los distintos acercamientos intentados para aumentar la sobrevivencia de estos embriones biopsiados y congelados en día 3, los resultados fueron bajos cuando la técnica aplicada era el congelamiento lento (Joris y col. 1999, Magli y col 1999 y 2006, Ciotti y col 2000, Jerichó y col 2003).

Por ello, progresivamente se modificó esta modalidad, sugiriéndose el congelamiento de blastocistos en día 5 para embriones biopsiados previamente en día 3. Esta nueva modalidad tiene la ventaja adicional que sólo embriones cromosómicamente normales para los cromosomas analizados por PGD serán criopreservados. Así esta estrategia reduce el número de embriones criopreservados por paciente (Escribá y col 2008).

A pesar de que inicialmente los protocolos de criopreservación de blastocistos que utilizaban métodos de congelación lento no tuvieron éxito, progresivamente se fueron presentando resultados que mejoraban las tasas de sobrevivencia (Nakayama y col 1995, Ludwig y col 1998, Mukaida y col 1998, Menezes y col 2000, Quintans y col 2003).

Con el surgimiento de la técnica de vitrificación, ésta comenzó a ser una alternativa al congelamiento lento y sus resultados tanto en sobrevivencia como tasa de embarazo posterior al descongelamiento resultaron ser superiores (Yokota y col 2000 y 2001, Mukaida y col 2001 y 2003, Lieberman y col 2002 a y b, 2003, Vanderzwalmen y col 2002 y 2003, Liebermann y Tucker, 2004).

Si bien en la literatura hay muchos reportes de embarazo y nacimiento después de la vitrificación de blastocistos humanos con zona pelúcida (ZP) intacta (Youssry y col 2008), son muchos menos los que presentan resultados en

blastocistos con ZP abierta (haciendo eclosión o eclosionados) (Hiraoka y col 2004, Parriego y col 2007).

Las observaciones realizadas por Magli y col (Magli y col 1999) indicaron claramente que la creación de una apertura en la ZP en embriones humanos afecta negativamente la sobrevida de los mismos después de su congelación/descongelación por un método lento de congelación. Así Joris y col (Joris y col 1999) reportaron que después del congelamiento/descongelamiento un número significativamente más bajo de blastómeras estaban intactas respecto al grupo control. Además, Magli y col (Magli y col 1999) reportaron que el número de embriones lisados fue significativamente mayor en aquellos que habían sufrido apertura de la ZP previamente al congelamiento.

Hay entonces consenso en que los embriones que han sufrido biopsia de blastómeras en día 3 de desarrollo y fueron criopreservados en ese estado en un programa de diagnóstico genético preimplantación tienen una menor capacidad de recuperación después de la criopreservación lenta que los embriones no biopsiados (Joris y col 1999, Ciotti y col 2000).

Algunas modificaciones a los métodos de criopreservación convencional han mostrado mejorar la sobrevida de embriones clivados biopsiados (Vanderzwalmen y col 2002, Jerichó y col 2003), mientras que otros abordajes alternativos, como el congelamiento en estadios de desarrollo posteriores, también fueron utilizados con distintos grados de éxito. El comportamiento de los blastocistos humanos es diferente del de los embriones clivados cuando se los pone en contacto con crioprotectores. Los blastocistos son menos permeables tanto a los crioprotectores como al agua y se deshidratan más lentamente en contacto con una solución de crioprotectores (Zheng WT y col 2005). Estas características hacen a los blastocistos más vulnerables al daño producido por la formación del hielo intracelular. Si se trata en particular de blastocistos provenientes de embriones biopsiados, se sabe que después de producida la apertura de la ZP los blastocistos expandidos reaccionan en forma diferente a soluciones hipertónicas cuando se los compara con blastocistos que tienen las ZP intactas. Cuando los blastocistos tienen la ZP abierta se observa un descenso

más pronunciado y uniforme en el volumen del blastocele. Esto sugeriría una más marcada deshidratación (Zech y col 2005).

Por otra parte, la diferencia más importante observada entre el congelamiento lento y la vitrificación de blastocistos después de la descongelación parecería deberse a la falta de colapso de la cavidad blastocélica durante el proceso de vitrificación. De este modo, durante el congelamiento lento la deshidratación ocurre en un período largo del tiempo, de manera tal que la formación de cristales de hielo intracelular en el medio concentra la sacarosa extracelular. Así, mientras este proceso facilita la deshidratación celular, también permite el colapso de la cavidad blastocélica. La rápida deshidratación y congelamiento -que ocurre en menos de un minuto- producida por la vitrificación no permite un colapso completo del blastocele. De ese modo parecería más sencillo para el blastocisto vitrificado regresar a su estado de expansión original (Stehlik y col 2005).

Nuestros resultados, si bien preliminares y haciendo la salvedad de tratarse del reporte de un único caso, demuestran que blastocistos con ZP abierta que fueron vitrificados/desvitrificados pueden ser recuperados eficientemente y que su vitalidad no se ve afectada, al menos en la mayor parte de ellos.

Estos resultados coinciden con los publicados por Zech y col (Zech y col 2005) quienes reportaron la sobrevida de 81.1% de blastocistos eclosionados post-desvitrificación utilizando como contenedor hemipajuelas y por Escribá y col (Escribá y col 2008) que obtuvieron un 84% de recuperación de blastocistos biopsiados utilizando como contenedor pajuelas francesas.

Escribá y col (Escribá y col 2008) mostraron además un 48.8% de evolución de estos blastocistos desvitrificados. Zech y col (Zech y col 2005) reportaron 7 embarazos y Parriego y col (Parriego y col 2007) publicaron un primer nacimiento de una niña a partir de blastocistos biopsiados y vitrificados en un programa de PGD.

El desarrollo de una técnica de criopreservación eficiente de blastocistos que fueron previamente biopsiados tiene una incidencia directa en los programas de PGD, ya que representa la oportunidad de utilizar efectivamente embriones normales que no fueron transferidos en fresco. En es-

te sentido, Escribá y col (Escribá y col 2008) reportaron que un 56% de sus pacientes de un programa de PGD que no tuvieron éxito al transferir sus embriones en fresco se vieron favorecidos por la posibilidad del uso de embriones biopsiados que fueron vitrificados.

A nuestro entender este es el primer reporte de la vitrificación/desvitrificación de blastocistos que habían sido biopsiados en día 3 de desarrollo utilizando como contenedor el *Cryotop* desarrollado por Kuwayama y col (Kuwayama y col 2005) y su evolución posterior.

En función de los resultados presentados en este trabajo se procederá a la implementación clínica de esta técnica en nuestro programa de diagnóstico genético preimplantación.

Agradecimientos

A la Srta Soledad Becerril por el tipeo del presente trabajo.

Referencias

- Aran B, Veiga A, Vidal F, Parriego M, Vendrell JM, Santaló J, Egozcue J, Barri PN. Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities. *Reprod Biomed Online* 2004;8:470-476.
- Behr B, Gebhardt J, Lyon J, Milki AA. Factors relating to a successful cryopreserved blastocyst transfer program. *Fertil Steril* 2002;77:697-699.
- Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;17:CD002118.
- Caglar GS, Asimakopoulos B, Nikolettos N, Diedrich K, Al-Hasani S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2005;10:381-388.
- Choi DH, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program. *Fertil Steril* 2000;74:838-839.
- Ciotti PM, Lagalla C, Ricco AS, Fabbri R, Forabosco A, Porcu E. Micromanipulation of cryopreserved embryos and cryopreservation of micromanipulated embryos in PGD. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:63-67.
- Escribá MJ, Zulategui JF, Galán A, Mercader A, Remohí J, de los Santos MJ. Vitrification of preimplantation genetically diagnosed human blastocysts and its contribution to the cumulative ongoing pregnancy rate per cycle by using a closed device. *Fertil Steril* 2008;89:840-846.
- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 2004;9:680-691.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocyst viability. *Fertil Steril* 2003;79:407-410.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C, Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2002;4 Suppl 3:31-36.
- Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod* 2004;19:2884-2888.
- Jericho H, Wilton L, Gook DA, Edgar DH. A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003;18:568-571.
- Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998;13:169-177.
- Joris H, Van den Abbeel E, Vos AD, Van Steirteghem A. Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Hum Reprod* 1999;14:2833-2837.
- Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, Lahloub TM, Ibrahim MH. Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2002;77:114-118.
- Kahraman S, Benkhalifa M, Donmez E, Biricik A, Sertyel S, Findikli N, Berkil H. The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques. *Prenat Diagn* 2004;24:307-311.
- Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online* 2004;9:164-170.
- Kosasa TS, McNamee PI, Morton C, Huang TT. Pregnancy rates after transfer of cryopreserved blastocysts cultured in a sequential media. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:2035-2039.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:300-308.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999;72:1073-1078.
- Liebermann J, Tucker MJ. Vitrifying and warming of human oocytes, embryos, and blastocysts: vitrification procedures as an alternative to conventional cryopreservation. *Methods Mol Biol* 2004;254:345-364.
- Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reprod Biomed Online* 2002;4:146-150.

- 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, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online* 2003;7:623-633.
- Ludwig M, Muschalla H, Al-Hasani S, Diedrich K. The effect of multiple cryopreservation procedures and blastomere biopsy on the in-vitro development of mouse embryos. *Hum Reprod* 1998;13:3165-3168.
- Magli MC, Gianaroli L, Fortini D, Ferraretti AP, Munné S. Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum Reprod* 1999;14:770-773.
- Magli MC, Sandalinas M, Escudero T, Morrison L, Ferraretti AP, Gianaroli L, Munné S. Double locus analysis of chromosome 21 for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Prenat Diagn* 2001;21:1080-1085.
- Magli MC, Gianaroli L, Grieco N, Cefalù E, Ruvolo G, Ferraretti AP. Cryopreservation of biopsied embryos at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2006;21:2656-2660.
- Ménéz Y, Nicollet B, Herbaut N, André D. Freezing co-cultured human blastocysts. *Fertil Steril* 1992;58:977-980.
- Menez YJ, Nicollet B, Dumont M, Hazout A, Janny L. Factors affecting human blastocyst formation in vitro and freezing at the blastocyst stage. *Acta Eur Fertil* 1993;24:207-213.
- Ménéz YJ, Veiga A, Pouly JL. Assisted reproductive technology (ART) in humans: facts and uncertainties. *Theriogenology* 2000;53:599-610.
- Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1998;13:2874-2879.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 2001;76:618-620.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 2003;18:384-391.
- Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities. *Mol Cell Endocrinol* 2001;183Suppl 1:S55-S58.
- Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod Biomed Online* 2002;4:183-196.
- Munné S. Preimplantation genetic diagnosis and human implantation—a review. *Placenta* 2003;24Suppl B:S70-S76.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 2000;73:1209-1218.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J, Sable D. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003;7:91-97.
- Nakayama T, Goto Y, Kanzaki H, Takabatake K, Hime-no T, Takakura K, Mori T, Noda Y. Developmental potential of frozen-thawed human blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 1995;12:239-243.
- Pagidas K, Ying Y, Keefe D. Predictive value of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated IVF-ET cycles among women with recurrent implantation failure. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:103-106.
- Parriego M, Solé M, Aurell R, Barri PN, Veiga A. Birth after transfer of frozen-thawed vitrified biopsied blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:147-149.
- Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Serkine AM, Tesquier L. Blastocyst stage transfer: the real benefits compared with early embryo transfer. *Hum Reprod* 2000;15Suppl 6:24-30.
- Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, Pasqualini RS. Birth resulting from transfer of blastocysts cryopreserved with propanediol after spontaneous hatching. *Reprod Biomed Online* 2003;6:66-68.
- Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol* 2005;53:159-165.
- Simopoulou M, Harper JC, Fragouli E, Mantzouratou A, Speyer BE, Serhal P, Ranieri DM, Doshi A, Henderson J, Rodeck CH, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis of chromosome abnormalities: implications from the outcome for couples with chromosomal rearrangements. *Prenat Diagn* 2003;23:652-662.
- Son WY, Yoon SH, Park SJ, Yoon HJ, Lee WD, Lim JH. Ongoing twin pregnancy after vitrification of blastocysts produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome: Case report. *Hum Reprod* 2002;17:2963-2966.
- Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod* 2003;18:137-139.
- Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005;11:53-57.
- Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12:779-796.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, Bollen N, Zech H, Mukaida T, Takahashi K, Schoysman R. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoele cavity before vitrification. *Hum Reprod* 2002;17:744-751.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, Bollen N, van Roosendaal E, Vandervorst M, Schoysman R, Zech N. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod* 2003;18:1504-1511.

- Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum Reprod 1993;8:1055-1060.
- Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R. Integration of blastocyst transfer for all patients. Fertil Steril 2002;77:693-696.
- Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, Araki Y. Successful pregnancy following blastocyst vitrification: case report. Hum Reprod 2000;15:1802-1803.
- Yokota Y, Yokota H, Yokota M, Sato S, Araki Y. Birth of healthy twins from in vitro development of human refrozen embryos. Fertil Steril 2001;76:1063-1065.
- Youssry M, Ozmen B, Zohni K, Diedrich K, Al-Hasani S, . Current aspects of blastocyst cryopreservation. Reprod Biomed Online 2008;16:311-320.
- Zech NH, Lejeune B, Zech H, Vanderzwalmen P. Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. Reprod Biomed Online 2005;11:355-361.
- Zheng WT, Zhuang GL, Zhou CQ, Fang C, Ou JP, Li T, Zhang MF, Liang XY. Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non-transferable embryos. Hum Reprod 2005;20:1615-1618.





HALITUS
INSTITUTO MÉDICO
"En el inicio de la vida y después..."
Dir. Méd. Dr. R. Sergio Pasqualini

"En el inicio de la vida y después..."

» DEPARTAMENTOS MÉDICOS

GINECOLOGÍA | OBSTETRICIA | FERTILIDAD Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA | LABORATORIO ESPECIALIZADO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA
DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PREIMPLANTACIÓN - DGA | HEMATOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN | PROTOLOGÍA MAMARIA
PROLOGÍA CERVICAL | GINECOLOGÍA INFANTIL Y JUVENIL Y PROCREACIÓN RESPONSABLE | UROGINECOLOGÍA | ENDOSCOPIA GINECOLÓGICA
DISFUNCIONES SEXUALES FEMENINAS | DISFUNCIONES SEXUALES MASCULINAS | ANDROLOGÍA | UROLOGÍA | GENÉTICA | NUTRICIÓN
EMBOUZACIÓN Y TERAPIA ENDOVASCULAR | PSICOLOGÍA | ECOGRAFÍA, ECO-DOPPLER Y ECOGRAFÍA 4D
CLIMATERIO, MENOPAUSIA Y OSTEOPOROSIS | DERMATOLOGÍA Y ESTÉTICA

| WWW.HALITUS.COM | 5273-2000 CONTACT CENTER | MARCELO T. DE ALVEAR 2084 - CP1122 - BS AS - ARGENTINA |