

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
  - a. Título.
  - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
  - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
  - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
  - e. Introducción.
  - f. Material y métodos.
  - g. Resultados.
  - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
  7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
  8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
    - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaria de SAMeR: info@samer.org.ar

# Criopreservación de ovocitos, una alternativa al congelamiento de embriones en pacientes infértiles

Luis María Augé, María Pía Zappacosta Villarroel, Patricia Jacqueline Buzzi, Alberto Valcárcel, Mercedes Leticia Guidobono, Tomás Caballero, Ramiro Quintana

Instituto de Fertilidad de Buenos Aires (IFER), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2016;31:96-108

## Resumen

*La criopreservación es una técnica que permite almacenar células y tejidos a temperaturas bajo cero para detener toda actividad biológica y, de esta manera, preservarlos para ser utilizados en el futuro. La criopreservación de ovocitos humanos maduros ofrece una solución aceptable para las pacientes que necesitan preservar su fertilidad. La principal ventaja del almacenamiento de ovocitos para este grupo de pacientes consiste en la ausencia de los problemas asociados con el almacenamiento de embriones. Las opciones respecto a la disposición futura de estos embriones sobrantes (cómo, cuándo y si serán o no utilizados) conllevan decisiones complejas desde el punto de vista ético y religioso para algunos pacientes. En la actualidad, y en base a que se han publicado varios estudios*

*prospectivos y aleatorizados con resultados comparables entre embarazos obtenidos a partir de ovocitos frescos y vitrificados provenientes de pacientes infértiles, así como también a la publicación de resultados obstétricos y perinatales de nacimiento de niños sanos sin incremento de alteraciones cromosómicas a partir de ovocitos vitrificados y a la Guía de Prácticas Clínicas de la ASRM (Sociedad Americana de Medicina Reproductiva) del año 2013 sobre vitrificación de ovocitos maduros se ha establecido que esta técnica no debe ser más considerada una técnica experimental. El objetivo de este trabajo fue evaluar los resultados reproductivos del uso de la técnica de vitrificación/desvitrificación de ovocitos supernumerarios, provenientes de pacientes infértiles que realizaron tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad, en quienes la criopreservación de embriones no representaba, por diferentes motivos, una alternativa posible. El presente estudio retrospectivo fue realizado entre septiembre de 2008 y diciembre de 2012 en el Departamento de Reproducción Asistida de Alta Complejidad del Instituto de Fertilidad (IFER). Un*

---

**Correspondencia:** Luis María Augé  
Correo electrónico: maugé@intramed.net

total de 583 parejas infértiles vitrificaron ovocitos supernumerarios luego de realizar un procedimiento de reproducción asistida de alta complejidad, de las cuales 107 (18,3%) desvitrificaron un total de 611 ovocitos. La edad promedio de las pacientes infértiles fue  $34,8 \pm 3,4$  años y el número promedio de ovocitos desvitrificados por pareja fue de  $5,7 \pm 2,8$ . De los 611 ovocitos, sobrevivieron a la vitrificación/desvitrificación un total de 562 (92,0%). Todos ellos fueron inseminados y la tasa de fertilización obtenida fue 66,9% (376/562). Se obtuvieron 332 embriones (88,3%), de los cuales evolucionaron y se transfirieron 263 (79,2%), realizándose 107 transferencias. Se transfirieron un total de 132 embriones de muy buena calidad (Clase III y Clase IV), lo que representa un 50,2%. El número de embriones de buena/regular calidad (Clase II) transferidos fue de 108 (41,1%), mientras que se transfirieron un total de 23 embriones (8,7%) de mala calidad (Clase I). La tasa global de embarazo clínico por transferencia obtenida fue 30,8% (33/107) mientras que la tasa de implantación fue 13,7% (36/263). La tasa de aborto fue de 30,3% (10/33). La tasa de nacimiento por transferencia fue de 21,5% (23/107). Entre los pacientes que vitrificaron/desvitrificaron 6 o menos ovocitos y los que vitrificaron/desvitrificaron más de 6 ovocitos, la tasa de sobrevivida fue del 89,6%, 277/309 vs 94,4%, 285/302, la tasa de fecundación fue del 63,5%, 176/277 vs 70,1%, 200/285, el porcentaje de embriones de buena calidad transferidos fue del 49,0%, 47/96 vs 50,9%, 85/167, la tasa de embarazo clínico/transferencia fue del 27,3%, 9/33 vs 32,9%, 24/73, la tasa de implantación fue del 15,0%, 25/167 vs 11,5%, 11/96, la tasa de aborto fue del 22,2%, 2/9 vs 33,3%, 8/24 y la tasa de nacimiento por transferencia fue del 28,0%, 7/25 vs 21,9%, 16/73; estos grupos no presentaron diferencias significativas. Estos resultados indican que, en nuestro grupo de pacientes, el efecto del número de ovocitos desvitrificados no incidió en los parámetros reproductivos. Cuando comparamos los resultados reproductivos obtenidos para pacientes menores de 38 años y pacientes mayores de 38 años (independientemente del número de ovocitos vitrificados/desvitrificados) observamos que la tasa de sobrevivida (91,5%, 460/503 vs 94,4%, 102/108), la tasa de fecundación (68,7 %, 316/460 vs 58,8%, 60/102) y el porcentaje de embriones de buena calidad transferidos (51,1%, 113/221 vs 45,2%, 19/42) no presentaron

diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, la tasa de embarazo clínico/transferencia (36,4%, 32/88 vs 5,5%, 1/18), la tasa de implantación (15,8%, 35/221 vs 2,4%, 1/42) y la tasa de nacimiento por transferencia (25,0%, 22/88 vs 5,5%, 1/18) presentaron diferencias significativas a favor del grupo de pacientes menores de 38 años. La vitrificación ovocitaria ha demostrado ser una técnica simple, segura y eficiente para la preservación de gametas en numerosos centros de reproducción asistida a nivel mundial. Debe ser recomendada en forma individual y acorde a cada paciente. Las tasas de embarazo obtenidas son muy aceptables y comparables con la bibliografía publicada. Si bien aún son algo menores a las obtenidas con el uso de embriones criopreservados, creemos que puede ser ofrecida como alternativa en los Centros de Reproducción Asistida, dadas las ventajas adicionales respecto al congelamiento de embriones.

**Palabras claves.** Ovocitos, criopreservación, vitrificación, sobrevivida, tasa de embarazo.

## **Cryopreservation of oocytes, an alternative to embryo freezing in infertile patients**

### **Summary**

Cryopreservation is a technique that enables the storage of cells and tissues, freezing to a stop all biological activity. Mature human oocyte cryopreservation may provide an acceptable solution for patients who need to preserve fertility. The main advantage of storing oocytes is the lack of issues associated with embryo cryopreservation. There have been several prospective randomized studies with comparable results between pregnancies obtained from fresh and vitrified oocytes, as well as various publications assessing obstetric and perinatal outcomes which showed no chromosomal abnormalities increment in the offspring. The ASRM (American Society of Reproductive Medicine) Clinical Practice Guideline (2013) on mature oocyte vitrification states that this technique should not be considered as experimental. The aim of this study was to evaluate the reproductive outcomes of the vitrification / devitrification of supernumerary oocytes from infertile patients who underwent assisted reproductive techniques, and in whom embryos cryopreservation was not an alternative. This retrospec-

*tive study was performed between September 2008 and December 2012 in the Fertility Department of IFER. 583 infertile couples vitrified supernumerary oocytes after performing an In Vitro Fertilization, and 107 couples (18.3%) thawed 611 oocytes. The average age of infertile women was  $34.8 \pm 3.4$  years old, and the average number of oocytes devitrified per couple was  $5,7 \pm 2.8$ . A total of 562 oocytes (92.0%) survived the vitrification / devitrification procedure. All were inseminated and the fertilization rate was 66.9% (376/562). 332 embryos were obtained (88.3%), and 263 were transferred (79.2%). There were 132 (50.2%) good quality embryos (Class III and Class IV), 108 (41.1%) fair quality embryos (Class II) and 23 (8.7%) poor quality embryos (Class I) transferred. The clinical pregnancy rate per transfer obtained was 30.8% (33/107) while implantation rate was 13,7% (36/263). Miscarriage rate was 30.3% (10/33). The live birth rate per transfer was 21.5% (23/107). When comparing results from patients who vitrified 6 or less oocytes to those who vitrified more than 6 oocytes, there were not significant differences in terms of survival rate (89.6%, 277/309 vs 94.4%, 285/302), fertilization rate (63.5%; 176/277 vs 70.1%, 200/285), percentage of good quality embryos transferred (49.0%, 47/96 vs 50.9%, 85/167), clinical pregnancy rate / transfer (27.3%, 9/33 vs 32.9%, 24 /73), implantation rate (15.0%, 25/167 vs 11.5%, 11/96), abortion rate (22.2%, 2/9 vs 33.3% 8/24) and live birth rate per transfer (28.0%, 7/25 vs 21.9%, 16/73). When comparing reproductive outcomes obtained from patients younger than 38 years old to patients older than 38 years old (regardless of the number of oocytes vitrified / devitrified), the survival rate was 91.5%, 460/503 vs 94.4%, 102/108, fertilization rate was 68.7%, 316/460 vs 58.8%, 60/102 and the percentage of good quality embryos transferred was 51.1%, 113/221 vs 45.2%, 19/42 did not differ significantly between the two groups. However, clinical pregnancy rate / transfer was 36.4%, 32/88 vs 5.5%, 1/18), implantation rate was 15.8%, 35/221 vs 2.4%, 1/42) and live birth rate per transfer was 25.0% 22/88 vs 5.5%, 1/18) showed significant differences in favor of the younger group of patients. Oocyte vitrification is a simple, safe and efficient technique for the fertility preservation. It has different indications, fertile patients in need of fertility preservation for medical conditions; or in-*

*fertile patients who do not wish to freeze embryos while performing assisted reproduction treatments. This technique should be recommended individually and according to each patient. We believe it can be offered as a valuable alternative while counseling patients in Assisted Reproduction Centers.*

**Key words.** Oocyte cryopreservation, vitrification, survival rate, pregnancy rate.

## Introducción

La criopreservación es una técnica que permite almacenar células y tejidos a temperaturas bajo cero para detener toda actividad biológica, y de esta manera, preservarlos para ser utilizados en el futuro.<sup>1</sup> Uno de los mayores avances en los últimos años, ha sido el desarrollo y la mejora en los resultados de la criopreservación de ovocitos humanos maduros.

Este procedimiento puede ofrecer una solución aceptable para las pacientes que necesitan preservar su fertilidad. Sería de utilidad aplicarlo en aquellas mujeres con patologías benignas del ovario que requieren múltiples cirugías (endometriosis recurrente) o que disminuyen la reserva ovárica; previo a un tratamiento oncológico, ante la necesidad de la remoción de uno o ambos ovarios, o por el efecto deletéreo sobre los mismos de la quimio o radioterapia; también ante la posibilidad de una futura menopausia prematura, entre las que debemos tener en cuenta las causas autoinmunes. También puede ser considerado en causas sociales como el deseo de postergación de la maternidad por motivos personales, laborales o en pacientes sin pareja. Otros motivos a tener en cuenta serían por razones éticas y/o religiosas en parejas que no estén de acuerdo en la criopreservación de embriones en técnicas de fertilización asistida de alta complejidad.

La principal ventaja del almacenamiento de ovocitos para este grupo de pacientes infértiles consiste en la ausencia de los problemas asociados con el almacenamiento de embriones,<sup>2</sup> que radican, fundamentalmente, en la eventual pérdida de la vitalidad embrionaria al momento del descongelamiento; y en el grave problema que suscita la existencia de embriones sin destino, por las múltiples circunstancias por las que los embriones

no son requeridos por sus padres para realizar las transferencias.<sup>3,4</sup>

Debemos considerar otras ventajas que aporta la aplicación de esta técnica, tales como la posibilidad de congelar ovocitos ante la dificultad de obtener una muestra de semen en el momento de la recolección de ovocitos, durante un procedimiento de reproducción asistida; o para evitar los inconvenientes derivados de un posible síndrome de hiperestimulación ovárica.

Otra indicación sería la creación de bancos de ovocitos para los tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad que requieran ovodonación, ya que permite mayor flexibilidad en la coordinación de los ciclos entre la donante y la paciente receptora.

Por último, esta tecnología también es aplicable en lugares en que las legislaciones restrictivas respecto al congelamiento de embriones impidan la realización de estos procedimientos.<sup>5,6</sup>

Desde el punto de vista técnico, las características del ovocito (su tamaño y su forma esférica) interfieren con la correcta distribución de los crioprotectores utilizados durante el congelamiento lento. Dentro de las causas del daño de la congelación lenta debemos incluir a la formación de hielo intra y extracelular, el riesgo de una deshidratación excesiva, el efecto del aumento de las concentraciones de solutos y el hecho de que algunas estructuras subcelulares han mostrado ser muy sensibles a la congelación.<sup>7,8</sup>

Todos estos inconvenientes han sido, al menos parcialmente, superados con la optimización del desarrollo de la técnica de vitrificación de ovocitos.<sup>9</sup> La vitrificación es un proceso físico en el que un líquido es transformado en un sólido de forma vítrea. Básicamente, es el súper enfriamiento de un líquido a una temperatura a la que su viscosidad es tan alta que puede ser definido como un sólido.<sup>10,11</sup>

Históricamente, esta técnica fue originalmente aplicada por Rall y Fahy<sup>12</sup> en embriones de ratón. Pensis y col<sup>13</sup> lograron con éxito la sobrevida de ovocitos humanos desvitrificados. La fecundación y el desarrollo embrionario en humanos, a partir de ovocitos vitrificados, fueron conseguidos por Hunter y col en 1995.<sup>14</sup> Ya en 1999, Hong y col desarrollaron los primeros blastocistos humanos a partir de ovocitos vitrificados.<sup>15</sup> En ese año también Kuleshova y col publicaron el primer naci-

miento a partir de ovocitos vitrificados.<sup>16</sup> Pero fue recién a partir del año 2005 con los trabajos de Kuwayama y col que la técnica de vitrificación de ovocitos ha mostrado ser altamente eficiente.<sup>17-21</sup>

Si bien el reporte del primer caso de criopreservación eficiente de ovocitos humanos utilizando la técnica conocida como criopreservación lenta fue publicado por Chen en 1986,<sup>22</sup> esta técnica permaneció con resultados muy poco eficientes y variables, hasta la optimización de la nueva técnica de congelamiento rápido (vitrificación).<sup>23-28</sup>

La bibliografía presentada a la fecha muestra un escaso número de trabajos en los que los ovocitos vitrificados han provenido de pacientes infértiles.<sup>29</sup> La mayor parte de los mismos publican la utilización de ovocitos de mujeres jóvenes que son almacenados para realizar técnicas de ovodonación.<sup>30-33</sup> En un principio, la eficiencia clínica y seguridad de la criopreservación fue cuestionada por falta de ensayos clínicos bien controlados y las recomendaciones de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) del año 2006 y 2008, y de Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) del año 2006, establecían que la criopreservación de ovocitos sólo podría ser utilizada en la preservación de fertilidad en pacientes oncológicas, mientras que las otras indicaciones deberían ser consideradas experimentales.

En la actualidad, y en base a que se han publicado varios estudios prospectivos y aleatorizados con resultados comparables entre embarazos obtenidos de ovocitos frescos y vitrificados provenientes de pacientes infértiles, así también la publicación de resultados obstétricos y perinatales de nacimiento de niños sanos sin incremento de alteraciones cromosómicas a partir de ovocitos vitrificados,<sup>34</sup> la Guía de Práctica Clínica de la ASRM<sup>35</sup> del año 2013 sobre vitrificación de ovocitos maduros establece que esta técnica no debe ser considerada, en la actualidad, experimental, especificando que esta última guía reemplaza lo publicado en el 2008 sobre la criopreservación de ovocitos.

## Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar los resultados reproductivos del uso de la técnica de vitrificación/desvitrificación de ovocitos supernumerarios provenientes de pacientes infértiles que realizaron tratamientos de reproducción asistida de

alta complejidad, en quienes la criopreservación de embriones no representaba una alternativa posible.

### Materiales y métodos

El presente estudio retrospectivo fue realizado entre septiembre de 2008 y diciembre de 2012 en el Departamento de Reproducción Asistida de Alta Complejidad del Instituto de Fertilidad (IFER).

Durante este período, un total de 583 parejas infértiles vitrificaron ovocitos supernumerarios luego de realizar un procedimiento de reproducción asistida de alta complejidad, de las cuales 107 (18,3%) desvitrificaron un total de 611 ovocitos.

#### *Estimulación ovárica*

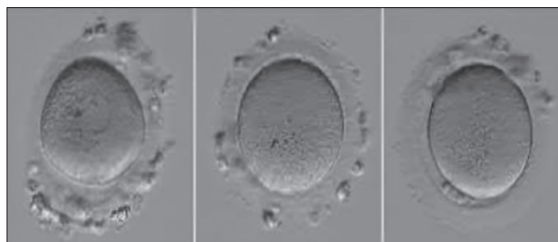
Los ovocitos frescos fueron obtenidos mediante hiperestimulación ovárica controlada, utilizando como esquemas de estimulación: un protocolo largo con análogos, agonistas de GnRh 0,1 ml/día subcutáneo hasta la menstruación y 0,05 ml/día subcutáneo hasta la aplicación de la HCG; o un protocolo basado en antagonistas de GnRh, iniciado a razón de una dosis diaria de 0,25 mg subcutáneo con un folículo dominante de 15 mm. En ambos casos, la hiperestimulación ovárica fue realizada utilizando FSH recombinante y HMG altamente purificada, a razón de 150 a 225 UI/día y ajustando las dosis según respuesta. El desarrollo folicular fue monitoreado por vía ultrasonográfica transvaginal y por dosaje de estradiol sérico. Cuando al menos 2 folículos tuvieron un diámetro mayor a 18 mm, los pacientes recibieron 10.000 IU de HCG. La aspiración folicular realizada por vía transvaginal para la captación ovocitaria fue realizada 36 horas después de la inyección de HCG.

#### *Manejo de los ovocitos*

Una vez que fueron identificados los complejos ovocito-cumulus oophorus fueron separados inmediatamente del fluido folicular, lavados y transferidos a un medio sintético (*Human Tubal Fluid modified, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EE.UU.*) suplementado al 2,5% con albúmina sérica humana (*Human Serum Albumin, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EE.UU.*) (HTFm+HSA). Concluida la captación ovocitaria, los complejos ovocito-cumulus fueron transferidos a una cápsula de 4 pozos que contenía 0,5

ml de medio G-IVF PLUS (*Vitrolife, Kungsbacka, Suecia*) y fueron cultivados en estufa a 6% CO<sub>2</sub> y 37°C durante 4 horas. La remoción completa de las células del cumulus y la corona fue realizada por exposición a hialuronidasa (80 UI/ml) (*Sigma Chemical, St Louis, MO, EE.UU.*) y posterior manipulación mecánica con pipetas de vidrio finas.

**Figura 1.** Ovocitos.



#### *Vitrificación*

La vitrificación ovocitaria fue realizada utilizando como contenedor el *Cryotop (Kitazato BioPharma Co, Shizuoka, Japón)*.<sup>17</sup> Para ello, en la tapa invertida de una placa de Petri estéril, se colocaron: 1 gota de 20µl de medio de cultivo (HTFm + HSA) y 3 gotas de 20µl de solución equilibrante (*ES, Code VT101, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co, Shizuoka, Japón*). Luego se transfirieron hasta 3 ovocitos con el mínimo volumen posible del medio G-IVF PLUS de la incubadora a la gota de HTFm+HSA. Con la punta de la pipeta de transferencia, se fusionaron la gota de HTFm+HSA con la de ES hasta permitir la mezcla espontánea de las dos soluciones durante 3 minutos. Luego se unió una gota de ES con medio fresco con la mezcla de gotas anterior y se los dejó así durante otros 3 minutos. Pasado este tiempo, se transfirieron los ovocitos con el mínimo volumen posible de solución al fondo de una nueva gota de ES con medio fresco durante 3 minutos. Inmediatamente después, los ovocitos fueron transferidos a una cápsula que contenía la solución de vitrificación (*VS, Code VT101, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co, Shizuoka, Japón*) durante 60 segundos como máximo y finalmente se los cargó en el *Cryotop* en un número no mayor de 4 ovocitos, 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  $-12.000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

**Figura 2.** Kit vitrificación.



### Desvitrificación

Para la desvitrificación, el *Cryotop* fue retirado del nitrógeno líquido e inmediatamente colocado en una cápsula de Petri chica conteniendo 2 ml de una solución de descongelación (TS, Code VT102, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co, Shizuoka, Japón) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto. Luego los ovocitos fueron transferidos a otra placa conteniendo una solución de dilución (DS) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los ovocitos fueron colocados en dos soluciones de lavados sucesivos, denominados WS1 (Code VT102, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co, Shizuoka, Japón) y WS2 (Code VT102, Vitrification Kit, Kitazato BioPharma Co, Shizuoka, Japón), durante 5 minutos en cada una de ellas, estando la primera a temperatura ambiente y la segunda a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Finalizados los lavados, los ovocitos fueron transferidos a una cápsula de 4 pozos que contenía 0,5 ml de medio G-IVF PLUS a  $37^{\circ}\text{C}$  y en estufa hasta el momento de la activación ovocitaria.

**Figura 3.** Kit desvitrificación.



### 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*, Kungsbäcka, Suecia) seguido por dos lavados en HTFm+HSA. La suspensión final de espermatozoides fue dejada a temperatura ambiente hasta el momento de la inseminación.

El procedimiento de Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) fue realizado según protocolo estandarizado.<sup>36</sup>

### Evaluación de fecundación y desarrollo embrionario

Diecisiete horas pasado el momento de la inseminación, los ovocitos 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 estufa a 6%  $\text{CO}_2$  y  $37^{\circ}\text{C}$  en grupos de hasta 4 en el interior de cápsulas de 4 pozos que contenían *G1.5 PLUS* (*Vitrolife*, Kungsbäcka, Suecia) hasta día 3 de desarrollo. La calidad embrionaria se evaluó siguiendo una modificación del criterio de Brugo Olmedo y colaboradores, en donde los embriones se clasifican de I a IV de acuerdo a la presencia o no de fragmentación, la velocidad de clivaje y a la simetría de las blastómeras, observándolos con microscopio invertido.

Las calidades propuestas son las siguientes:

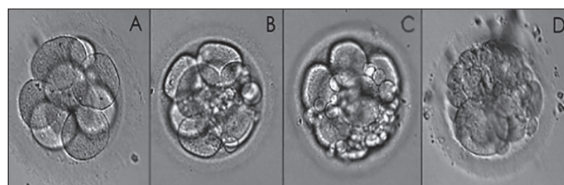
Embrión Clase I: Embrión de 4 a 8 células y múltiples fragmentos que cubren más de la mitad de la superficie del embrión.

Embrión Clase II: Embrión de 4 a 8 células que presenta fragmentación citoplasmática que cubre hasta el tercio de la superficie embrionaria.

Embrión Clase III: Embrión de 4 células sin fragmentos o entre 4 y 8 blastómeras desiguales con muy pocos o ningún fragmento citoplasmático.

Embrión Clase IV: Embrión de 6 a 8 células de igual tamaño y forma, sin fragmentos o con menos de 5% de fragmentos.

**Figura 4.** Calidad embrionaria. A. Embrión clase IV, B. Embrión clase III, C. Embrión clase II, D. Embrión clase I.



#### Preparación endometrial

La preparación endometrial se realizó con valerato de estradiol 4 - 8 mg/día hasta alcanzar un endometrio mayor o igual a 8 mm trilaminar (la dosis de la medicación fue regulada según el grosor endometrial), y luego, se agregó progesterona micronizada 600 - 800 mg/día. El día de comienzo de la progesterona, se desvitrificaron los ovocitos y luego fueron microinyectados. En todos los casos se realizó transferencia embrionaria intrauterina bajo guía ecográfica en día 2 ó 3 del desarrollo embrionario y el soporte de la fase lútea fue llevado a cabo con valerianato de estradiol 8 mg y progesterona micronizada 600 - 800 mg/día.

**Figura 5.** Endometrio trilaminar.

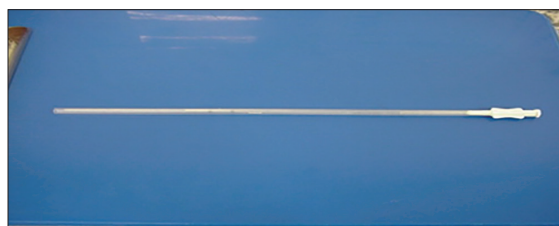


#### Transferencia embrionaria y tasa de embarazo

Las transferencias embrionarias intrauterinas se realizaron utilizando catéter de *Frydman* (*Frydman classic catéter 4,5, Laboratoire CCD, París, Francia*) y se transfirieron entre 1 y 3 embriones en día 2 ó 3 de desarrollo.

Se consideró embarazo clínico cuando se observó uno o más sacos gestacionales intraútero con actividad cardíaca positiva. La tasa de embarazo clínico por transferencia se determinó como el número de pacientes con embarazo clínico/número de pacientes transferidas. La tasa de implantación se calculó como el número de sacos gestacionales implantados intraútero/número de embriones transferidos.

**Figura 6.** Cánula de transferencia embrionaria.



#### Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando *test Chi<sup>2</sup>*, *test exacto de Fisher* o *t-test*, según fuera requerido. El análisis de los datos se realizó utilizando un paquete estadístico *Instat*.

#### Resultados

Durante el período en que fue realizado este estudio se desvitrificaron un total de 611 ovocitos correspondientes a 107 parejas infértiles.

La edad promedio de las pacientes infértiles fue  $34,8 \pm 3,4$  años (mínima 27 años, máxima 42 años) y el número promedio de ovocitos desvitrificados por pareja fue de  $5,7 \pm 2,8$ .

En un primer análisis, evaluamos los resultados generales de la técnica de vitrificación/desvitrificación de ovocitos: de los 611 ovocitos, sobrevivieron a la vitrificación/desvitrificación un total de 562 (92,0%). Todos ellos fueron inseminados y la tasa de fertilización obtenida fue 66,9% (376/562). Se obtuvieron un total de 332 embriones (88,3%), de los cuales evolucionaron y se transfirieron 263 (79,2%) en 107 transferencias.

Se transfirieron un total de 132 embriones de muy buena calidad (Clase III y Clase IV), lo que representa un 50,2%. El número de embriones de buena/regular calidad (Clase II) transferidos fue de 108 (41,1%), mientras que se transfirieron un total de 23 embriones (8,7%) de mala calidad (Clase I).

La tasa global de embarazo clínico por transferencia obtenida fue 30,8% (33/107) mientras que la tasa de implantación fue 13,7% (36/263). La tasa de aborto fue de 30,3% (10/33). La tasa de nacimiento por transferencia fue de 21,5% (23/107) (Tabla 1).

En un segundo análisis, se compararon los resultados reproductivos para las pacientes infértiles que desvitrificaron menos de 6 ovocitos ó más de 6 ovocitos (independientemente de la edad) (Tabla 2).

**Tabla 1.** Resultados reproductivos en las pacientes infértiles.

Edad	34,8 ± 34 años
Nº casos	107
Nº ovocitos desvitrificados	611
Embriones desvitrificados por paciente	5,7 ± 2,8
Sobrevida (%)	562/611 (92,0)
Tasa Fertilización	376/562 (66,9)
Embriones transferidos	263
Nº Embriones Clase IV	20/263 (7,6)
Nº Embriones Clase III	112/263 (42,6)
Nº Embriones Clase II	108/263 (41,1)
Nº Embriones Clase I	23/263 (8,7)
Embarazo clínico (%)	33/107 (30,8)
Tasa implantación (%)	36/263 (13,7)
Tasa aborto (%)	10/33 (30,3)
Tasa de nacimiento (%)	23/107 (21,5)
Nº de nacidos	26
Nº múltiples	1 doble y 1 triple

**Tabla 2.** Resultados reproductivos para las pacientes infértiles que desvitrificaron menos de 6 ovocitos o más de 6 ovocitos (independientemente de la edad).

Nº de ovocitos	≤ a 6 Mil	> a 6 Mil	p
Nº casos	73	33	
Nº ovos desvitrificados	302	309	
Sobrevida (%)	285/302 (94,4)	277/309 (89,6)	NS
Tasa Fertilización	200/285 (70,1)	176/277 (63,5)	NS
Embriones transferidos	167	96	
Nº Embriones Clase IV	9/167 (5,4)	11/96 (11,4)	NS
Nº Embriones Clase III	76/167 (45,5)	36/96 (37,5)	NS
Nº Embriones Clase II	70/167 (41,9)	38/96 (39,6)	NS
Nº Embriones Clase I	12/167 (7,2)	11/96 (11,5)	NS
Embarazo clínico (%)	24/73 (32,9)	9/33 (27,3)	NS
Tasa implantación (%)	25/167 (15,0)	11/96 (11,5)	NS
Tasa aborto (%)	8/24 (33,3)	2/9 (22,2)	NS
Tasa de nacimiento (%)	16/73 (21,9)	7/33 (21,2)	NS
Nº de nacidos	17	9	17
Nº múltiples	1 doble	1 triple	1 doble

A continuación se presentan los resultados reproductivos correspondientes a las pacientes infértiles cuya edad es ≤ a 38 años y para pacientes cuya edad es ≥ a 38 años (independientemente del número de ovocitos desvitrificados) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Resultados reproductivos para las pacientes infértiles cuya edad es ≤ a 38 años y para pacientes cuya edad es > a 38 años (independientemente del número de ovocitos desvitrificados).

Edad	≤ a 38 años	> a 38 años	p
Nº casos	88	18	
Nº ovos desvitrificados	503	108	
Sobrevida (%)	460/503 (91,5)	102/108 (94,4)	NS
Tasa Fertilización	316/460 (68,7)	60/102 (58,8)	NS
Embriones transferidos	221	42	
Nº Embriones Clase IV	17/221 (7,7)	3/42 (7,1)	NS
Nº Embriones Clase III	96/221 (43,4)	16/42 (38,1)	NS
Nº Embriones Clase II	89/221 (40,3)	19/42 (45,2)	NS
Nº Embriones Clase I	19/221 (8,6)	4/42 (9,5)	NS
Embarazo clínico (%)	32/88 (36,4)	1/18 (5,5)	p < 0,01
Tasa implantación (%)	35/221 (15,8)	1/42 (2,4)	p < 0,01
Tasa aborto (%)	10/35 (28,6)	0/1 (0)	p < 0,01
Tasa de nacimiento (%)	22/88 (25,0)	1/18 (5,5)	p < 0,01
Nº de nacidos	25	1	17
Nº múltiples	1 doble y 1 triple	0	1 doble

Por último, se procedió a generar 4 grupos de pacientes:

a) Pacientes que desvitrificaron entre 1 y 6 ovocitos maduros y cuya edad era menor o igual a 38 años (< 6 ovocitos y ≤ 38 años).

b) Pacientes que desvitrificaron entre 1 y 6 ovocitos maduros y cuya edad era mayor a 38 años (< 6 ovocitos y > 38 años).

c) Pacientes que desvitrificaron más de 6 ovocitos maduros y cuya edad era menor o igual a 38 años (> 6 ovocitos y ≤ 38 años).

d) Pacientes que desvitrificaron más de 6 ovocitos maduros y cuya edad era mayor a 38 años (> 6 ovocitos y > 38 años).



Los resultados reproductivos correspondientes a estos 4 grupos se presentan en la Tabla 4.

El número total de partos fue de 23 y nacieron 26 bebés sanos. Del total, uno correspondió a un nacimiento doble (del grupo  $\leq 6$  ovocitos y  $\leq 38$  años) y el otro a un nacimiento triple (del grupo  $> 6$  ovocitos y  $\leq 38$  años).

**Tabla 4.** Resultados reproductivos en los 4 grupos considerados.

Nº de ovocitos	$\leq a 6$ MII		$> a 6$ MII	
	$\leq a 38$ años	$> a 38$ años	$\leq a 38$ años	$> a 38$ años
Nº casos	63	10	25	8
Nº ovos desvitrificación	265	37	238	71
Sobrevida (%)	249/265 (93,9)	36/37 (97,3)	211/238 (88,6)	66/71 (92,9)
Tasa Fertilización	177/249 (71,1)	23/36 (63,9)	139/211 (65,8)	37/66 (56,1)
Embriones transferidos	149	18	72	24
Nº Embriones Clase IV	8/149 (5,4)	1/18 (5,5)	9/72 (12,5)	2/24 (8,3)
Nº Embriones Clase III	71/149 (47,6)	5/18 (27,8)	25/72 (34,7)	11/24 (45,8)
Nº Embriones Clase II	59/149 (39,6)	11/18 (61,2)	30/72 (41,7)	8/24 (33,3)
Nº Embriones Clase I	11/149 (7,4)	1/18 (5,5)	8/72 (11,1)	3/24 (12,6)
Embarazo clínico (%)	23/63 (36,5)	1/10 (10)	9/25 (36,0)	0/8 (0)
Tasa implantación (%)	24/149 (16,1)	1/18 (5,5)	11/72 (15,2)	0/24 (0)
Tasa aborto (%)	8/23 (34,7)	0/1 (0)	2/9 (22,2)	-
Tasa de nacimiento (%)	15/63 (23,8)	1/10 (10)	7/25 (28)	-
Nº de nacidos	16	1	9	0
Nº múltiples	1 doble	0	1 triple	0

## Discusión

El desarrollo de un método confiable, como lo es en la actualidad la criopreservación de ovocitos, presenta un interés médico muy importante tanto para la población fértil como infértil. La utilidad de la preservación de la fertilidad a través de la vitrificación de ovocitos en la población fértil radica en los motivos ya expuestos: razones médicas o sociales.

En la población infértil puede ser útil en aquellas pacientes que disponen de un número de ovocitos mayor a los que se desean fertilizar en fresco en un primer intento, y que no consideran la criopreservación de embriones como una alternativa posible.

Debido al esfuerzo continuo por disminuir el número de embriones transferidos en procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad, con el consiguiente descenso de la tasa de embarazo múltiple, se producen una gran cantidad de embriones supernumerarios.<sup>37</sup>

La capacidad de almacenar ovocitos supernumerarios en forma efectiva, nos permitirá, en un futuro, eliminar o disminuir la gran cantidad de embriones supernumerarios que existen en todos los centros de fertilidad. El almacenamiento de embriones presenta críticas desde el punto de vista ético, ya que, una gran parte de los mismos resulta sin destino al no ser transferidos a sus progenitores.<sup>38</sup>

La baja eficiencia en los resultados de las tecnologías disponibles en las últimas dos décadas, había limitado la implementación de la criopreservación ovocitaria en la práctica clínica. A pesar de que los protocolos de congelamiento lento ovocitario habían mejorado,<sup>39, 40</sup> recién con la introducción del método de vitrificación se ha podido lograr un importante avance de esta metodología para los tratamientos de reproducción asistida.

A pesar de los promisorios resultados obtenidos en una serie de centros de reproducción asistida,<sup>41-43</sup> la aceptación universal de la técnica de vitrificación de ovocitos era considerada controversial.<sup>5, 44</sup> A partir de la publicación de la Guía de Práctica sobre la Criopreservación de Ovocitos Maduros de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva del año 2013, se establece que esta técnica no debe ser considerada experimental en base a la bibliografía existente, aplicada tanto en pacientes donantes de ovocitos, como en pacientes infértiles.<sup>43, 45, 46</sup>

Los resultados de embarazos mostrados en la bibliografía a partir de ovocitos vitrificados/desvitrificados, son aún menores a los obtenidos a partir del uso de embriones supernumerarios criopreservados. En este sentido, Young y colaboradores, publicaron tasas de supervivencia al descongelar cigotas del  $93,6 \pm 14,3\%$ , de embriones clivados en día 2 del  $84,6 \pm 15,4$ , de embriones de día 3 del

73,6 ± 24,7, con una tasa de embarazo global de 25,0% (317/1269), siendo del 13,1% (71/543) para mujeres mayores de 40 años o mujeres jóvenes bajas respondedoras (con menos de 3 ovocitos maduros captados) y del 33,4% (246/736) para mujeres menores de 40 años.<sup>23</sup>

Estos resultados concuerdan con los publicados previamente en la literatura, Salumets y col,<sup>47</sup> Senn y col,<sup>48</sup> quienes obtuvieron tasas de supervivencia para ovocitos pronucleados de 86,5% y 80,4% respectivamente, mientras que para embriones de día 2 una supervivencia de 61,7% y 71,8% respectivamente. Salumets y colaboradores reportaron un 43,1% de supervivencia para embriones congelados en día 3. El hecho de que la supervivencia de los embriones luego del congelamiento/descongelamiento esté altamente relacionada con el estadio de desarrollo en el que fueron congelados no es novedosa, ya que los embriones clivados son más vulnerables al congelamiento debido a un aumento del área total en donde los procesos de deshidratación, penetración del crioprotector, rehidratación y salida del crioprotector (comunes al proceso de congelación/descongelación) deben ocurrir en forma correcta en todas las células que constituyen el embrión.<sup>49</sup>

Las tasas de embarazo reportadas por estos autores coinciden con las obtenidas por diversos autores en la literatura.<sup>48, 50-52</sup>

La obtención de resultados reproductivos muy similares entre la vitrificación/desvitrificación ovocitaria con microinyección de espermatozoides y los obtenidos por el congelamiento/descongelamiento de embriones, nos permite suponer que gradualmente la primera de estas técnicas se impondrá en un futuro próximo como alternativa de almacenamiento en los centros de reproducción asistida, debido a las grandes ventajas adicionales respecto al congelamiento de embriones.

Nuestros resultados en una población no seleccionada de 107 pacientes infértiles mostraron una alta tasa de supervivencia luego de la desvitrificación de los ovocitos (92,0%, 562/611) y de fertilización (66,9%, 376/562), con aceptables tasas de embarazo clínico por transferencia (30,8%, 33/107), de implantación (13,7%, 36/263) y de nacimiento (21,5%, 23/107), comparables con las obtenidas del uso de ovocitos desvitrificados y en fresco en países con restricciones legales sobre el número de ovocitos a fertilizar (Tabla 1).<sup>26, 45, 46, 53, 54</sup>

Por otra parte, la totalidad de los niños nacidos a la fecha fueron normales (26 en 23 partos) en nuestro grupo de pacientes. Si bien es un número pequeño de nacidos, estos resultados están en concordancia con las observaciones bibliográficas respecto a que la vitrificación ovocitaria no estaría asociada con un incremento en el riesgo de eventos adversos perinatales.<sup>41, 55</sup>

Cuando profundizamos el análisis de los resultados obtenidos, el primer elemento que evaluamos fue el efecto del número de ovocitos vitrificados/desvitrificados (independientemente de la edad de las pacientes), sobre los resultados reproductivos.

En nuestras pacientes la tasa de supervivencia (89,6%, 277/309 vs 94,4%, 285/302), la tasa de fecundación (63,5%, 176/277 vs 70,1%, 200/285), el porcentaje de embriones de buena calidad transferidos (49,0%, 47/96 vs 50,9%, 85/167), la tasa de embarazo clínico/transferencia (27,3%, 9/33 vs 32,9%, 24/73), la tasa de implantación (15,0%, 25/167 vs 11,5%, 11/96), la tasa de aborto (22,2%, 2/9 vs 33,3%, 8/24) y la tasa de nacimiento por transferencia (28,0%, 7/25 vs 21,9%, 16/73) no presentaron diferencias significativas entre los pacientes que vitrificaron/desvitrificaron 6 o menos ovocitos y los que vitrificaron/desvitrificaron más de 6 ovocitos. Estos resultados indican que, en nuestro grupo de pacientes, el efecto del número de ovocitos desvitrificados no incidió en los parámetros reproductivos analizados (Tabla 2), lo que no es coincidente con algunos de los trabajos publicados al respecto. En varias publicaciones presentadas en la bibliografía, la mayor parte de los parámetros reproductivos vistos están influenciados por el número de ovocitos desvitrificados, esperándose mejores resultados reproductivos cuanto mayor número de ovocitos se disponga para vitrificar, desvitrificar, fertilizar embriones para transferencia.<sup>45, 56</sup>

El segundo de los elementos a analizar en nuestros resultados es la edad de las pacientes. Cuando comparamos los resultados reproductivos obtenidos para pacientes menores de 38 años y pacientes mayores de 38 años (independientemente del número de ovocitos vitrificados/desvitrificados) observamos que la tasa de supervivencia (91,5%, 460/503 vs 94,4%, 102/108), la tasa de fecundación (68,7%, 316/460 vs 58,8%, 60/102)

y el porcentaje de embriones de buena calidad transferidos (51,1%, 113/221 vs 45,2%, 19/42) no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, la tasa de embarazo clínico/transferencia (36,4%, 32/88 vs 5,5%, 1/18), la tasa de implantación (15,8%, 35/221 vs 2,4%, 1/42) y la tasa de nacimiento por transferencia (25,0%, 22/88 vs 5,5%, 1/18) presentaron diferencias significativas a favor del grupo de pacientes menores de 38 años (Tabla 3).

Estos resultados ponen de manifiesto una vez más la importancia de la edad de las pacientes que vitrifican ovocitos, con respecto a sus expectativas reales de embarazo y nacimiento. Por otra parte, coinciden con lo publicado en la bibliografía respecto a las bajas chances de embarazo y nacimiento para mujeres mayores de 38 años que criopreservan ovocitos.<sup>30, 57</sup>

Finalmente, en el total de la muestra, los resultados reproductivos obtenidos cuando agrupamos a la totalidad de las pacientes en función del número de ovocitos vitrificados (más o menos de 6) y la edad de las mismas (mayores o menores de 38 años) indican que la tasa de embarazo clínico por transferencia (36,5%, 23/63 vs 36,0%, 9/25), la tasa de implantación (16,1%, 24/149 vs 15,2%, 11/72) y la tasa de nacimiento por transferencia (23,8%, 15/63 vs 28,0%, 7/25) fueron semejantes en las pacientes menores de 38 años, independientemente de la cantidad de ovocitos vitrificados/desvitrificados. En las mujeres mayores de 38 años la expectativa de embarazo (10,0%, 1/10 vs 0%, 0/8), de implantación embrionaria (5,5%, 1/18 vs 0%, 0/24) y nacimiento (10%, 1/10 vs 0%, 0/8) es muy baja, independientemente del número de ovocitos vitrificados/desvitrificados.

El resto de los parámetros reproductivos no presentó diferencias significativas entre los 4 grupos estudiados.

La importancia de este análisis radica en que nos permite evaluar cuál es la población que presenta mejores expectativas de éxito al plantearse la posibilidad de la vitrificación de ovocitos, información imprescindible para el consejo a las pacientes acerca de las verdaderas chances de obtener embarazo y nacimiento por el uso de esta técnica.

Por otra parte, y en función de los resultados obtenidos, creemos que la vitrificación de ovoci-

tos constituye un avance muy importante en las técnicas de reproducción asistida, permitiendo, ya en este momento, reducir el gran problema ético, social y económico que significa un número supernumerario de embriones a conservar, evitando, en un futuro, la difícil situación de decidir sobre los embriones sobrantes.

En nuestras manos esta técnica ha mostrado ser un método eficiente y satisfactorio, convirtiéndose en una herramienta más para ofrecer a las pacientes que consultan por tratamientos de fertilidad, y más importante aún, ha resultado una alternativa aceptable desde el punto de vista clínico.

## Conclusión

La vitrificación ovocitaria ha demostrado ser una técnica simple, segura y eficiente para la preservación de gametas en numerosos centros de reproducción asistida a nivel mundial.

Tiene diferentes indicaciones, tanto en pacientes fértiles que necesitan de la preservación de la fertilidad por causas médicas, siendo las oncológicas las más frecuentes, como sociales por la postergación de la maternidad con la consiguiente disminución de la calidad y cantidad ovocitaria debido a la edad; como en pacientes infértiles, que, por diferentes motivos, no quieren congelar embriones durante la realización de tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad.

En todos los casos, esta técnica debe ser recomendada en forma individual y acorde a cada paciente.

Hemos logrado implementar este desarrollo tecnológico en nuestro instituto con tasas de embarazo obtenidas muy aceptables y comparables con la bibliografía publicada. Si bien aún son algo menores a las obtenidas con el uso de embriones criopreservados, creemos que puede ser ofrecida como alternativa en los Centros de Reproducción Asistida, dadas las ventajas adicionales respecto al congelamiento de embriones.

*Agradecimientos.* Agradecemos a todos los médicos, biólogos, personal de enfermería y personal administrativo que hicieron posible y colaboraron con nuestro estudio.

*Sostén financiero.* Sin financiamiento externo para la ejecución del trabajo.

**Referencias**

1. Dovey S. Oocyte cryopreservation: advances and drawbacks. *Minerva Ginecol* 2012; 64(6): 485-500.
2. Gook DA, Osborn SM, Johnston WI. Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1995; 10: 654-658.
3. Klock SC. Embryo disposition: the forgotten "child" of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 2004; 49(1): 19-23.
4. Bankowski BJ, Lyerly AD, Faden RR, Wallach EE. The social implications of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 2005; 84(4): 823-832.
5. Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Kort HI, Vajta G. The efficacy and safety of human oocyte vitrification. *Semin Reprod Med* 2009; 27: 450-455.
6. Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martínez M, Carmona L, Pellicer A. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril* 2013; 99(7): 1994-1999.
7. Kelly SM, Buckett WM, Abdul-Jalil AK, Tan SL. The cryobiology of assisted reproduction. *Minerva Ginecol* 2003; 55(5): 389-398.
8. De Santis L, Coticchio G. Theoretical and experimental basis of slow freezing. *R B M Online* 2011; 23(3): 290-297.
9. Smith GD, Motta EE, Serafini P. Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification. *R B M Online* 2011; 23(3): 298-306.
10. 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.
11. Arav A, Natan Y. Vitrification of Oocytes: From Basic Science to Clinical Application. *Adv Exp Med Biol* 2013; 761: 69-83.
12. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-575.
13. Pensis M, Loumaye E, Psalti I. Screening of conditions for rapid freezing of human oocytes: preliminary study toward their cryopreservation. *Fertil Steril* 1989; 52: 787-794.
14. Hunter JE, Fuller BJ, Bernard A, Jackson A, Shaw RW. Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants; initial studies on fertilization and embryonic development. *Hum Reprod* 1995; 10: 1184-1188.
15. Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, Cha KY. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999; 72: 142-146.
16. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999; 14: 3077-3079.
17. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300-308.
18. Ruvalcaba L, Martínez R, Cuneo S, Chanona J, Beltrán M, Bermudez A. Improving donor programs with an oocyte bank using vitrification. *Fertil Steril* 2005; 84(1): S70.
19. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85: 108-111.
20. Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 80: 223-224.
21. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 72-79.
22. Chen C. Pregnancy after human cryopreservation. *Lancet* 1986; 1: 884-886.
23. Young E, Kenny A, Puigdomenech E, Van Thillo G, Tiverón M, Piazza A. Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved oocytes: case report. *Fertil Steril* 1998; 70: 360-361.
24. Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, Pasqualini RS. Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium. *Hum Reprod* 2002; 17: 3149-3152.
25. Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 152-163.
26. La Sala GB, Nicoli A, Villani MT, Pescarini M, Gallinelli A, Blickstein I. Outcome of 518 salvage oocyte-cryopreservation cycles performed as a routine procedure in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 2006; 86: 1423-1427.
27. La Sala GB, Nicoli A, Villani MT, Di Girolamo R, Capodanno F, Blickstein I. The effect of selecting oocytes for insemination and transferring all resultant embryos without selection on outcomes of assisted reproduction. *Fertil Steril* 2009; 91(1): 96-100.
28. De Santis L, Cino I, Rabelotti E, Papaleo E, Calzi F, Fusi FM, Brigante C, Ferrari A. Oocyte cryopreservation: clinical outcome of slow-cooling protocols differing in sucrose concentration. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 57-63.
29. Chang CC, Elliott TA, Wright G, Shapiro DB, Toledo AA, Nagy ZP. Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years. *Fertil Steril* 2013; 99(7): 1891-1897.
30. Cobo A, Garcia-Velasco JA, Domingo J, Remohí J. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? *Fertil Steril* 2013; 99(6): 1485-1495.
31. García JI, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Hum Reprod* 2011; 26(4): 782-790.
32. Trokoudes KM, Pavlides C, Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertil Steril* 2011; 95(6): 1996-2000.

33. Figueira R de C, Braga DP, Setti AS, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Relevance of assisted hatching in an oocyte donation programme using egg cryobanking: a prospective randomised study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 164(1): 48-51.
34. Forman EJ, Xinying li, Ferry KM, Scott K, Treff NR, Scott RT. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel paired randomized controlled Trial using DNA fingerprinting. *Fertil Steril*. 2012; 98(3): 644-649.
35. The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology: Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril* 2013; 99(1): 37-43.
36. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey. 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.
37. Adashi EY, Barri PN, Berkowitz R, Braude P, Bryan E, Carr J, Cohen J, Collins J, Devroey P, Frydman R, Gardner D, Germond M, Gerris J, Gianaroli L, Hamberger L, Howles C Jones H Jr, Lunenfeld B, Pope A, Reynolds M, Rosenwaks Z, Shieve LA, Serour GI, Shenfield F, Templeton A, van Steirteghem A, Veeck L, Wennerholm UB. Infertility therapy-associated multiple pregnancies (births): an ongoing epidemic. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 515-542.
38. Amato P, Brzyski R, Braverman, A, Benward J, Stein A, Lamb D, Steinbock B, Wilder B, Reindollar R, Francis L, Robertson J, Daar J, Fisseha S, Ralston S, Sauer M, Spillman M, Rebar R, Tipton S. Disposition of abandoned embryos: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013; 99(7): 1848-1849.
39. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001; 16: 411-416.
40. Fosas N, Marina F, Torres PJ, Jové I, Martín P, Pérez N, Arnedo N, Marina S. The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes. *Hum Reprod* 2003; 18: 1417-1421.
41. Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, Ruvalcaba Castellón LA, García Amador MI, Montoya Sarmiento JE. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 608-610.
42. Cobo A, Remohí J, Chang CC, Nagy ZP. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. *R B M Online* 2011; 23(3): 341-346.
43. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011; 96(2): 277-285.
44. Vajta G, Nagy ZP, Cobo A, Conceicao J, Yovich J. Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. *R B M Online* 2009; 19(3): 1-7.
45. Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, Scarduelli C, Capalbo A, Vajta G, Remohí J, Ragni G, Ubaldi FM. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod* 2012; 27(6): 1606-1612.
46. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, et al. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 505-512. Level I.
47. Salumets A, Suikkari AM, Tonu Möls V, Söderström-Anttila A, et al. Influence of oocytes and spermatozoa on early embryonic development. *Fertil Steril* 2002; 78(5): 1082-1087.
48. Senn A, Vozzi C, Chanson A, De Grandi P. Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage. *Fertil Steril* 2000; 74(5): 946-952.
49. Hartshorne G. The embryo. *Hum Reprod* 2000; 15(4): 31-41.
50. Demoulin A, Jouan C, Gerday C, Dubois M. Pregnancy rates after transfer of embryos obtained from different stimulation protocols and frozen at either pronucleate or multicellular stages. *Hum Reprod* 1991; 6: 799-804.
51. Kalliopi E, Loutradi EM, Kolibianakis C, Christos A, Venetis Evangelos G, Papanikolaou. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008; 90(1): 186-193.
52. Abdelhafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2010; 20: 209-222.
53. Levi Setti PE, Albani E, Matteo M, Morengi E, Zannoni E, Baggiani AM, Arfuso V, Patrizio P. Five years (2004-2009) of a restrictive law-regulating ART in Italy significantly reduced delivery rate: analysis of 10,706 cycles. *Hum Reprod* 2013; 28(2): 343-349.
54. Ubaldi F, Anniballo R, Romano S, Baroni E, Albricci L, Colamaria S, Capalbo A, Sapienza F, Vajta G, Rienzi L. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Hum Reprod* 2010; 25 (5): 1199-1205.
55. Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C, Aittomäki K, Hazekamp J, Nygren KG, Selbing A, Loft A. Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum Reprod* 2009; 24(9): 2158-2172.
56. Quaas AM, Melamed A, Chung K, Bendikson KA, Paulson RJ. Egg banking in the United States: current status of commercially available cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2013; 99(3): 827-831.
57. Lockwood GM. Social egg freezing: the prospect of reproductive 'immortality' or a dangerous delusion? *R B M Online* 2011; 23(3): 334-340.