

## Trabajo Original

# Situación actual de los sistemas automáticos y cerrados de vitrificación

Gabriel Álvarez

Especialista en Embriología Clínica.

INPA UBA-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

In Vitro Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2018;33(2):46-52

### Resumen

*La vitrificación se ha convertido hace más de una década en la técnica dominante para la criopreservación de embriones y ovocitos. En los últimos años se han propuesto cambios en busca de aumentar la repetibilidad de resultados entre operadores y la seguridad de la técnica con relación a la posibilidad de contaminación de las muestras con agentes infecciosos en los termos de nitrógeno líquido. El objetivo de esta revisión bibliográfica fue encontrar la evidencia actual*

*de la eficiencia de los sistemas de vitrificación abiertos y cerrados, y del sistema automático de equilibrio para vitrificación de ovocitos y embriones.*

**Palabras claves.** *Vitrificación abierta, vitrificación cerrada, vitrificación automática.*

### Current situation of automatic and closed vitrification systems

#### Summary

*Vitrification has become the main technique for the cryopreservation of embryos and oocytes more than a decade ago. In recent years, changes have been proposed in order to increase the repeatability of results between operators and the safety of the technique in relation to the pos-*

---

**Correspondencia:** Gabriel Álvarez  
Correo electrónico: galvarez@fvvet.uba.ar

*sibility of samples contamination with infectious agents within liquid nitrogen tanks. The aim of this literature review was to find current evidence of the efficiency of open and closed vitrification systems, and of the automatic equilibration system for oocyte and embryo vitrification.*

**Key words.** *Open vitrification, closed vitrification, automatic vitrification.*

## Introducción

El desarrollo de las técnicas de vitrificación produjo un gran avance en la eficiencia de los tratamientos de reproducción médicamente asistida, al permitir la criopreservación exitosa de ovocitos,<sup>1,2</sup> y un aumento considerable en la sobrevida de los embriones en todos los estadios de desarrollo,<sup>3</sup> pero especialmente en blastocistos,<sup>4,5</sup> sin afectar en absoluto la capacidad de implantación.

Las técnicas actuales de vitrificación difieren en varios aspectos, como las soluciones, los parámetros de equilibrio y dilución, los soportes, el enfriamiento y los métodos de almacenamiento y calentamiento.<sup>6</sup> La gran variedad de técnicas plantea un problema cuando las muestras criopreservadas son trasladadas de un laboratorio a otro. La diferencia principal entre sistemas los clasifica en abiertos y cerrados, siendo los abiertos aquellos en los que la muestra toma contacto directo con nitrógeno líquido, y los cerrados aquellos que pretenden mantener las muestras completamente aisladas del contacto con nitrógeno en el enfriamiento, almacenamiento y calentamiento.<sup>7</sup>

El nitrógeno líquido no es estéril y los termos no son recipientes sellados que permitan mantener la esterilidad. Por lo tanto, el contacto directo con el nitrógeno líquido puede ser una fuente de infección desde el punto de vista teórico. Sin embargo, no se ha informado la transmisión de infecciones a pesar de haberse realizado entre 600.000 y un millón de transferencias

embrionarias con material vitrificado utilizando sistemas abiertos.<sup>8</sup> La única publicación de una infección atribuible a la contaminación cruzada en nitrógeno líquido ocurrió con una gran cantidad de sangre humana almacenada en contenedores plásticos inadecuados para tal fin.<sup>9</sup>

En los últimos años los dispositivos abiertos y cerrados no han sufrido modificaciones relevantes. Todos los cambios que aumentaron la eficiencia de la técnica se realizaron sobre las soluciones que se utilizan por igual con ambos tipos de soportes. El objetivo de esta revisión bibliográfica fue encontrar la evidencia actual de la eficiencia de los sistemas de vitrificación abiertos y cerrados y del sistema automático de equilibrio para vitrificación de ovocitos y embriones.

## Sistema Automático de Vitrificación

El estándar de oro para la vitrificación es el método Cryotop.<sup>10,11</sup> Con este método se obtienen resultados de sobrevida en embriones superiores al 90%, y tasas de implantación y nacidos vivos equivalentes a los obtenidos con transferencia de embriones en fresco.<sup>12,13</sup> El sistema GAVI de vitrificación automática fue desarrollado para intentar estandarizar el procedimiento entre operadores y clínicas, automatizando los pasos de equilibrio y vitrificación en un sistema cerrado, pero dejando aún los pasos de calentamiento y recuperación en manos del operador.<sup>14</sup> El sistema fue desarrollado en Australia y consiste en un mecanismo robotizado de pipetas para el intercambio de las soluciones de equilibrio y vitrificación en placas que son posteriormente selladas por el robot antes de sumergirse en nitrógeno líquido. La máquina procesa hasta cuatro de estas placas por vez, las cuales deben ser sumergidas en nitrógeno manualmente. Para el calentamiento se sumerge una de estas placas en un baño de agua a 37° C, luego se abre el sellado y se introduce la solución de calentamiento en la placa. A partir de aquí el procedimiento es similar al Cryotop convencional.<sup>14</sup> La sobrevida obtenida con cigotos de ratón fue de 99% con

Cryotop y de 88% con GAVI. Al evaluar el desarrollo a blastocisto de embriones de ratón vitrificados en estadio de clivaje temprano, tanto el sistema Cryotop como GAVI dieron tasas menores que los embriones sin vitrificar. Una prueba reducida con blastocistos humanos no mostró diferencia de sobrevida entre ambos sistemas.<sup>14</sup>

El único estudio aleatorizado hallado por el autor se realizó con ovocitos de donante y no encontró diferencia en la sobrevida al utilizar el sistema Cryotop (76,6%) o GAVI (78,6%).<sup>15</sup> El mismo grupo hizo una publicación informal sobre el primer nacimiento al utilizar esos ovocitos, pero no brindó información al respecto más allá de confirmar el nacimiento.

### Sistemas abiertos y cerrados de vitrificación

Dos categorías se distinguen fácilmente en los sistemas de vitrificación. Los sistemas abiertos permiten el contacto directo de la muestra

con el nitrógeno líquido y los sistemas cerrados lo evitan. Esto hace al sistema abierto inseguro, desde el punto de vista de la posible transmisión de infecciones, y al sistema cerrado seguro.

La mayoría de los soportes derivan de los dispositivos artesanales desarrollados para investigación y posteriormente industrializados; sin embargo, las modificaciones comerciales propuestas no siempre cumplen las especificaciones de seguridad descriptas.<sup>8</sup> Se han publicado al menos treinta tipos de soportes y en el mercado se encuentran al menos quince versiones comerciales. La mayoría de ellos son modificaciones menores a los publicados inicialmente: Open Pulled Straw (OPS), Cryoloop y Cryotop.<sup>10, 16, 17</sup> Todos estos sistemas fueron concebidos como abiertos. La mayoría de los sistemas denominados cerrados son modificaciones de estos últimos.<sup>8</sup> Un análisis de los diversos dispositivos disponibles permite dividirlos en los cinco grupos detallados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación de los sistemas de vitrificación. Adaptado de Vajta y col.<sup>8</sup>**

Sistemas	Dispositivos	Características
Totalmente abiertos	Cryotop, Cryotech, Cryoleaf, Cryolock, Vitri-Inga, Cryoloop, OPS	Muestra en contacto directo con N <sub>2</sub> líquido durante todo el procedimiento y almacenamiento.
Vitrificación abierta y almacenamiento cerrado	OPS. Cualquiera de los anteriores que disponga de un contenedor adicional que pueda sellarse antes del almacenamiento.	Muestra en contacto directo con N <sub>2</sub> líquido durante el procedimiento. Sin contacto con nitrógeno durante el almacenamiento.
Vitrificación semicerrada	Rapid-I, CryotopSC, Cryohook	Muestra en contacto con vapor de N <sub>2</sub> durante el procedimiento.
Vitrificación cerrada en pajuelas	Cryotip, Cryopette	Muestra en pajuela sellada.
Soportes en contenedor cerrado. Vitrificación y almacenamiento cerrado	Vitrisafe, CBS HSV	Muestra en soporte abierto, contenedor sellado antes del contacto con N <sub>2</sub> .

En los sistemas semicerrados el contacto con vapor de nitrógeno es inevitable, por lo que la posible contaminación mediada por el vapor de nitrógeno no puede excluirse.<sup>18</sup> En la vitrificación cerrada en pajuelas, estas se sumergen en agua a 37° C para el calentamiento y luego se sumergen en el medio apropiado para recuperar los embriones. La seguridad se ve comprometida debido a que el exterior de la pajuela no mantiene la esterilidad al pasar por el termo de almacenamiento y porque tampoco el agua para el calentamiento es estéril.<sup>8</sup> El último grupo, "Soportes en contenedor cerrado", es el que brinda la mayor seguridad en términos de aislamiento de la muestra. En este grupo se utilizan soportes del tipo abiertos que son introducidos en un contenedor que es sellado antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Pero este tipo de procedimiento puede comprometer seriamente la velocidad en el enfriamiento de la muestra debido a que la capa de aire que la rodea tendrá efecto de aislante térmico.<sup>8</sup>

### Velocidad de intercambio térmico

El principio de la vitrificación es eliminar la formación de cristales de hielo durante la criopreservación de las muestras a temperaturas por debajo del punto de fusión de las soluciones. Esto puede lograrse al utilizar altas concentraciones de crioprotectores y realizando el procedimiento con velocidades elevadas de enfriamiento y calentamiento. Al alcanzar las concentraciones máximas de crioprotectores que no son tóxicas para las células a temperatura ambiente, la estrategia de mejora del proceso se concentró en aumentar las velocidades de intercambio térmico. La forma más fácil de alcanzar altas tasas de enfriamiento y calentamiento es utilizando el menor volumen de solución posible y la mayor conductividad térmica entre la solución que contiene la muestra y el nitrógeno líquido.<sup>8</sup> El intento más simple fue dejar caer gotas de la solución en nitrógeno líquido; sin embargo, el volumen necesario para formar una gota libre (> 3µl) y la capa de vapor de nitrógeno que rodea a la gota con un me-

dio caliente y la mantiene sobre la superficie del nitrógeno por 8-10 segundos disminuyen considerablemente la velocidad de enfriamiento.<sup>19</sup> Los soportes fueron diseñados para reducir el volumen de solución que contiene la muestra (1-0,5µl) y permitir la inmersión inmediata en la fase líquida del nitrógeno evitando que la capa de vapor envuelva a la muestra.<sup>20, 21</sup> Reducir el espesor de la pared del contenedor de la muestra puede ayudar a aumentar la velocidad de intercambio térmico, al igual que eliminar totalmente las capas que puedan actuar de aislante térmico. En la Tabla 2 se muestran las velocidades estimadas de intercambio térmico alcanzadas por los diferentes sistemas.

Si bien se ha propuesto que la velocidad de enfriamiento extremadamente alta es un requisito para la sobrevivencia de los ovocitos luego de la vitrificación,<sup>10</sup> recientemente se han publicado estudios en los que la velocidad de enfriamiento alcanzada con los sistemas cerrados es capaz de mantener tasas de sobrevivencia comparables a las de los sistemas abiertos, si la velocidad de calentamiento es lo suficientemente alta.<sup>26-28</sup> Estos autores demostraron que la causa principal de daño celular no es la formación de cristales durante el enfriamiento, sino la recrystalización durante el calentamiento. Según los mismos autores, la velocidad de calentamiento es tan importante como la de enfriamiento.<sup>26-29</sup> Por lo tanto, los sistemas cerrados pueden ser tan eficientes como los abiertos si se puede mantener la velocidad de calentamiento en valores lo suficientemente altos.

### Resultados con embriones

A partir de las mejores tasas de sobrevivencia alcanzadas con la vitrificación en comparación con el congelamiento lento,<sup>30</sup> la vitrificación ha desplazado al congelamiento lento en las clínicas de reproducción médicamente asistida para la criopreservación de ovocitos y embriones. La vitrificación de blastocistos con sistemas abiertos ha producido resultados clínicos comparables con los obtenidos con blastocistos frescos.<sup>12</sup> A partir del planteo teórico sobre el

**Tabla 2. Velocidades de intercambio térmico alcanzadas por los diferentes sistemas durante el enfriamiento y calentamiento. Datos recopilados de Roy y col,<sup>14</sup> Panagiotidis y col,<sup>22</sup> Vanderzwalmen y col,<sup>23</sup> Castello y col,<sup>24</sup> Desai y col,<sup>25</sup> Seki y Manzur.<sup>26</sup>**

Sistemas	Dispositivos	$\Delta T^\circ$ ( $^\circ\text{C}/\text{min}$ ) enfriamiento	$\Delta T^\circ$ ( $^\circ\text{C}/\text{min}$ ) calentamiento
Totalmente abiertos	Cryotop, Cryotech, Cryoleaf, Cryolock, Vitri-Inga, Cryoloop, OPS	-23000	42000
Vitrificación abierta y almacenamiento cerrado	OPS	-23000	42000
Vitrificación semicerrada	Rapid-I, CryotopSC, Cryohook	-1200 -5200	43500
Vitrificación cerrada en pajuelas	Cryotip, Cryopette	-12000	No disponible
Soportes en contenedor cerrado. Vitrificación y almacenamiento cerrado	Vitrisafe, CBS HSV	-1300 -1600	20000
Sistema automático	Cassete	-14100	11200

riesgo de transmisión de infecciones a través del nitrógeno líquido surge la inquietud de utilizar sistemas cerrados de vitrificación.<sup>7, 12, 31, 32</sup> Pero esto se acompaña con la preocupación de los efectos negativos que tiene la menor velocidad de enfriamiento alcanzada por estos sistemas.

En un estudio retrospectivo que comparó la vitrificación de blastocistos con sistemas abiertos (106 ciclos) versus cerrados (226 ciclos) no se hallaron diferencias significativas en las tasas de sobrevida de los embriones (98% vs. 95,8%), embarazo clínico (47,6% vs. 42,2%), implantación (42,9% vs. 35,6%) y nacido vivo (39,8% vs. 32,1%). Tampoco se observaron diferencias en la edad gestacional, peso y longitud al nacimiento.<sup>33</sup> El único estudio aleatorizado hallado que comparó la vitrificación de blastocistos con ambos sistemas tampoco encontró diferencias en los parámetros evaluados: sobrevida de los embriones (84,1% vs. 82,1%), embarazo clíni-

co (45,9% vs. 42,4%), implantación (25,6% vs. 24,5%) o nacido vivo (41,2% vs. 41%), abierto vs. cerrado respectivamente.<sup>22</sup>

### Resultados con ovocitos

Se hallaron dos estudios aleatorizados que comparan la vitrificación de ovocitos con sistemas abiertos versus cerrados. En el primero, al realizar 75 ciclos en cada grupo se encontró diferencia en la sobrevida de los ovocitos en favor del sistema abierto (91% vs. 82,9%), pero el resto de los parámetros evaluados resultaron comparables: fecundación (73,4% vs. 82,5%), embarazo clínico (28% vs. 36%), implantación (10,1% vs. 13,8%) y nacido vivo (24% vs. 36%), con los sistemas abierto y cerrado respectivamente.<sup>34</sup> La segunda publicación no encontró diferencia significativa entre los sistemas abierto y cerrado en la sobrevida de los ovocitos (89,9% vs. 93,7%) ni en la fecundación (81,4% vs. 74,3%), pero ha-

lló diferencia en favor del sistema abierto en una menor tasa de degeneración luego del ICSI (6,1% vs. 11,4%), mayor tasa de clivaje temprano (52,1% vs. 34,1%) y mayor número de células en los embriones al 3<sup>er</sup> día ( $7,6 \pm 2,8$  vs.  $6,8 \pm 2,8$ ), abierto versus cerrado respectivamente.<sup>35</sup>

## Conclusiones y consideraciones finales

El sistema automático de equilibrio y vitrificación resultaría similar al sistema manual abierto. Sin embargo, hasta la fecha un solo grupo ha publicado resultados. Debe tenerse en cuenta que todo el procedimiento de calentamiento sigue siendo manual, lo que deja aún la variabilidad entre operadores en la mitad del procedimiento.

En cuanto a los sistemas de vitrificación abiertos y cerrados, la velocidad de intercambio térmico en el enfriamiento y el calentamiento de los sistemas cerrados es considerablemente menor. Sin embargo, los trabajos publicados no encontraron diferencia entre sistemas abiertos y cerrados para la vitrificación de embriones. A diferencia de lo anterior, para la vitrificación de ovocitos los trabajos publicados encontraron diferencias en la sobrevida y la calidad de los embriones obtenidos en favor de los sistemas abiertos.

Hasta la fecha solo hay publicados tres trabajos aleatorizados y no hay publicaciones que registren la contaminación de muestras en nitrógeno líquido; por lo tanto, no hay suficiente evidencia para recomendar los sistemas cerrados.

## Referencias

1. Cobo A, García-Velasco JA, Coello A y col. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril* 2016; 105: 755-764.e8
2. Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010; 25: 2239-2246.
3. Cobo A, de los Santos MJ, Castello D et al. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril* 2012; 98: 1138-1146.
4. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D et al. Consistent and reproducible outcomes of blastocyst biopsy and aneuploidy screening across different biopsy practitioners: a multicentre study involving 2586 embryo biopsies. *Hum Reprod* 2016; 31: 199-208.
5. Zhang S, Luo K, Cheng D et al. Number of biopsied trophoctoderm cells is likely to affect the implantation potential of blastocysts with poor trophoctoderm quality. *Fertil Steril* 2016; 105: 1222-1227.e4
6. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 779-796.
7. Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod* 2009; 24: 2457-2467.
8. Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online* 2015; 30: 325-333.
9. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346: 137-140.
10. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300-308.
11. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 2007; 67: 73-80.
12. Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril* 2005; 84: 88-92.
13. Kato O, Kawasaki N, Bodri D, Kuroda T, Kawachiya S, Kato K et al. Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 161: 46-50.
14. Roy TK, Brandi S, Tappe NM et al. Embryo vitrification using a novel semi-automated closed system yields in vitro outcomes equivalent to the manual Cryotop method. *Hum reprod* 2014; 29: 2431-2438.
15. Sole M, Polyzos N, Llagostera CG et al. Automatic vs. manual vitrification of human oocytes. preliminary results of the first randomised controlled trial using sibling oocytes. *Fertil Steril* 2017; 108.e57

16. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-58.
17. Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 342-347.
18. Grout BW, Morris GJ. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology* 2009; 71: 1079-1082.
19. Landa V, Tepla O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. *Folia biologica* 1990; 36: 153-158.
20. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059-1069.
21. Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature* 1990; 345: 170-172.
22. Panagiotidis Y, Vanderzwalmen P, Prapas Y et al. Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study. *Reprod Biomed online* 2013; 26: 470-476.
23. Vanderzwalmen P, Ectors F, Grobet L et al. Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVM. *Reprod biomed online* 2009; 19: 700-707.
24. Castello D, Cobo A, Mestres E et al. Pre-clinical validation of a closed surface system (Cryotop SC) for the vitrification of oocytes and embryos in the mouse model. *Cryobiology* 2018; 81: 107-116.
25. Desai NN, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod Biology Endocrinol* 2013; 11: 41.
26. Seki S, Mazur P. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196 degrees C in dilutions of a standard vitrification solution. *PLoS one* 2012; 7: e36058.
27. Mazur P, Seki S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196 degrees C at 95 degrees to 70,000 degrees C/min and warmed at 610 degrees to 118,000 degrees C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology* 2011; 62: 1-7.
28. Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 2009; 59: 75-82.
29. Jin B, Mazur P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse. *Scientific reports* 2015; 5: 9271.
30. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008; 90: 186-193.
31. Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003; 46: 146-152.
32. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000; 40: 110-116.
33. Chen Y, Zheng X, Yan J et al. Neonatal outcomes after the transfer of vitrified blastocysts: closed versus open vitrification system. *Reprod biol endocrinol* 2013; 11: 107.
34. Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Prapas N, Zikopoulos K, Georgiou I et al. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Reproductive biomedicine online* 2013; 26: 595-602.
35. De Munck N, Santos-Ribeiro S, Stoop D et al. Open versus closed oocyte vitrification in an oocyte donation programme: a prospective randomized sibling oocyte study. *Hum reprod* 2016; 31: 377-384.