

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN:  
BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA APLICADA A LA REPRODUCCIÓN  
HUMANA ASISTIDA**

**LA VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS COMO  
MÉTODO PARA LA PRESERVACIÓN MÉDICA  
O NO MÉDICA DE LA FERTILIDAD EN LA  
MUJER**

**Autor: MARTA FERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**Tutora: BEATRIZ AMOROCHO LLANOS**

CURSO 2022/2023

Alcobendas, septiembre 2023

## ÍNDICE

1. Índice.....	1
2. Abreviaturas.....	2-4
3. Resumen y palabras clave.....	5
4. Introducción.....	6-17
5. Objetivos.....	17-18
6. Métodos.....	18-21
7. Resultados.....	21-28
8. Discusión .....	28-30
9. Conclusiones.....	30-31
10. Bibliografía.....	32-35
11. Anexo	

## **ABREVIATURAS**

**2PN:** dos pronúcleos

**AFC:** antrall follicle count (recuento de folículos antrales)

**AMH:** anti-Mullerian Hormone (hormona antimülleriana)

**BS:** basic solution (solución básica)

**CBS:** cryo bio system

**COE:** criopreservación de ovocitos electivos

**CPAs:** cryoprotective agents (agentes crioprotectores)

**DET:** double embryo transfer (transferencia de dos embriones)

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DS:** dilution solution (solución diluyente)

**EG:** etilenglicol

**EOC:** estimulación ovárica controlada

**E2:** estradiol

**ES:** equilibrium solution (solución de equilibrio)

**ETS:** enfermedades de transmisión sexual

**FA:** folículos antrales

**FIV:** fecundación in vitro

**FSH:** follicle stimulating hormone (hormona foliculoestimulante)

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropina

**hCG:** human chorionic gonadotropin (gonadotropina coriónica humana)

**IA:** inteligencia artificial

**ICSI:** intracytoplasmic sperm injection (inyección intracitoplasmática de espermatozoides)

**ISD:** in-straw dilution

**IMC:** índice de masa corporal

**LH:** luteinizing hormone (hormona luteinizante)

**MCI:** masa celular interna

**MII:** metafase II

**OPS:** open-pulled straw

**PROH:** propanodiol

**PVP:** polivinilpirrolidona

**RNV:** recién nacido vivo

**SET:** single embryo transfer (transferencia de un único embrión)

**SHO:** síndrome de hiperestimulación ovárica

**TS:** thawing solution (solución de desvitrificación)

**VS:** vitrification solution (solución de vitrificación)

**WS:** washing solution (solución de lavado)

## RESUMEN

La vitrificación es una técnica que consiste en obtener los óvulos de la mujer para conservarlos a temperaturas muy bajas (-196°C) durante un tiempo indefinido. Este proceso no solo conlleva el proceso de vitrificación, sino que previamente la paciente debe someterse a una estimulación ovárica controlada (EOC) y a una punción folicular. Una vez que se obtienen los ovocitos se procede a vitrificarlos y cuando sea necesario su uso, serán microinyectados mediante la técnica de ICSI. Más tarde y más en concreto en el día 5 o día 6 del desarrollo embrionario, tendrá lugar la transferencia embrionaria. Esta técnica se utiliza para preservar la fertilidad femenina por causas médicas o no (mujeres que quieren retrasar el momento de ser madres) y para optimizar los ciclos de FIV. Hace más de dos décadas se consiguió el primer RNV gracias a la vitrificación de ovocitos. A partir de ese momento, las técnicas han ido evolucionando, lo que ha dado lugar a mayores tasas de éxito y a la introducción de la vitrificación de ovocitos en las clínicas de reproducción asistida de todo el mundo. Además, con los años y la demostración de su eficacia, ha habido un claro aumento de la demanda de las pacientes, especialmente para la preservación social de su fertilidad debido a la edad. El sistema ampliamente utilizado en la mayoría de las clínicas para la vitrificación de los ovocitos se denomina Cryotop® (Kitazato, Japón), el cual ofrece los mejores resultados clínicos en comparación con otros sistemas de vitrificación. Su diseño permite vitrificar con un volumen mínimo además de alcanzar las mejores tasas de enfriamiento y calentamiento existentes. Por consiguiente, esta metodología es la que arroja mejores tasas de supervivencia embrionaria obteniendo tasas de embarazo y RNV sanos en casa similares a las de ovocitos frescos. Respecto a las tasas de éxito de la vitrificación abierta y la vitrificación cerrada hay opiniones contradictorias y ninguna es extremadamente sólida. En definitiva, estos últimos años ha habido un gran aumento en el número de pacientes y ciclos que requieren de la vitrificación de ovocitos y por ello, se necesita evaluar el estado actual de la vitrificación de ovocitos explorando las técnicas actuales y sus tasas de éxito, las aplicaciones clínicas, el auge de la criopreservación electiva ovocitaria y las implicaciones futuras.

Palabras Clave: preservación, fertilidad, médicas, vitrificación, ovocitos, Cryotop, sistema abierto, sistema cerrado, fresco.

## INTRODUCCIÓN

La criopreservación de ovocitos es una técnica de reproducción asistida que consiste en obtener los ovocitos de la mujer para conservarlos posteriormente a temperaturas muy bajas durante un tiempo indefinido (Lee SJ et al., 2006). Este procedimiento requiere de la utilización de agentes crioprotectores (CPAs) y nitrógeno líquido para "congelar" los ovocitos extraídos previamente de los ovarios de la mujer mediante un procedimiento quirúrgico (punción folicular). Estos agentes crioprotectores van a proteger a los ovocitos durante el proceso inicial haciendo que estos reduzcan el contenido acuoso de su interior protegiéndolos de los efectos de las bajas temperaturas. Los agentes crioprotectores son sustancias utilizadas en todos los protocolos de criopreservación de ovocitos y, en función de su capacidad, existen dos tipos de crioprotectores: permeables y no permeables. Los permeables sustituyen el líquido acuoso del interior del óvulo impidiendo la formación de cristales de hielo ya que ayudan a contrarrestar el efecto de las altas concentraciones de solutos (glicerol, DMSO, PROH y EG). Los crioprotectores no permeables favorecen la deshidratación celular controlada, lo cual también impide la formación de cristales de hielo y el colapso celular (PVP, dextranos, albúmina, sacarosa, glucosa y trealosa). Normalmente estos crioprotectores se utilizan de forma conjunta para lograr una mayor eficacia (Marina S et al., 2022). Por tanto, la criopreservación permite conservar los ovocitos manteniendo toda su viabilidad y capacidad biológica y de esta forma poder posponer la maternidad con garantías razonables (Jaiswal AN et al., 2022).

Actualmente, existen dos técnicas diferentes de criopreservación empleadas en reproducción asistida, aunque el objetivo de ambas es el mismo: mantener intactos los ovocitos para poder usarlos posteriormente.

- **Congelación lenta**: esta técnica induce la formación de cristales de hielo en el interior de los ovocitos. Lo que ocurre es que esta formación de cristales de hielo produce la destrucción de los ovocitos debido a la alta cantidad de agua que contienen en su interior (80%) y, por tanto, no superan correctamente el proceso de congelación y posterior descongelación ya que se ve alterada su estructura y su funcionalidad. Esta técnica recibe el nombre de congelación lenta porque el daño producido por los cristales de hielo se puede minimizar haciendo que la

temperatura descienda muy lentamente. Fue en el año 1986 donde se reportó el primer caso de recién nacido vivo sano a partir de un ovocito criopreservado mediante congelación lenta y con dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector (Chen C, 1986). A partir de esa fecha, han sido muchos los casos en los cuales se han reportado recién nacidos vivos sanos utilizando esta técnica, aunque con el tiempo, la congelación lenta convencional ofreció bajas tasas de supervivencia ovocitaria y embarazo (Oktay K et al., 2006), lo cual dio origen a la realización de múltiples estudios y a la posterior modificación del tipo de agente crioprotector utilizado, el volumen o su concentración, ya que el objetivo de la criopreservación es alcanzar resultados verdaderamente alentadores (Chen SU et al., 2005). Aun así, esta técnica se sigue realizando en la conservación de espermatozoides dando muy buenos resultados (en ovocitos está en completo desuso).

- **Vitrificación**: fue en 1860 cuando se describió por primera vez la idea de vitrificar los ovocitos, es decir, alcanzar un estado similar al vidrio y, en 1937 se retomó esa idea, pero no fue hasta 1985 cuando Rall y Fahy describieron una alternativa a la congelación lenta que consistía en solidificar una solución por un enfriamiento muy rápido, hasta formar un estado vidrioso debido al aumento de la viscosidad del medio (Rall WF et al., 1985). La vitrificación de ovocitos es una técnica en la que la solidificación no ocurre por cristalización y formación de hielo, sino por la extrema viscosidad del medio que se enfría a velocidades muy elevadas. Durante la vitrificación, el líquido se torna cada vez más viscoso hasta que las moléculas quedan inmobilizadas, la muestra deja el estado líquido y adquiere propiedades de sólido. En este caso, el sólido conseguido tiene una consistencia vidriosa, de ahí el nombre de la técnica. En la vitrificación, las células no son sometidas al efecto *chilling* (daños por enfriamiento que ocurren a unas temperaturas entre los 15°C Y -5°C) (Martino A et al., 1996) y, además, no se produce la formación de hielo. Sin embargo, esta técnica tiene un gran inconveniente ya que se requiere de una gran cantidad de crioprotectores (CPAs). El inconveniente de estas sustancias es que son tóxicas en concentraciones muy elevadas, sin embargo, una mezcla adecuada de CPAs puede mitigar estos efectos adversos, como veremos posteriormente. Hoy en día la vitrificación es la técnica más utilizada en los tratamientos de reproducción asistida y es en la que se va a centrar este trabajo (Remohí JA et al., 2012).



La vitrificación de ovocitos es empleada en los centros de reproducción asistida con tres indicaciones principales: preservación social femenina de la fertilidad, optimización de los ciclos de FIV y preservación femenina de la fertilidad por motivos médicos. La preservación de la fertilidad en la mujer hace referencia a las intervenciones médicas destinadas a mantener la fertilidad en una paciente cuya capacidad de ser madre se ve amenazada. La principal indicación de preservación de la fertilidad está dada en mujeres que se están sometiendo a tratamientos oncológicos los cuales pueden afectar a la función ovárica (quimioterapia o radioterapia), en pacientes con riesgo de pérdida de la función ovárica, mujeres que deciden postergar su maternidad o en pacientes con baja respuesta a la estimulación ovárica donde la vitrificación posibilita la consecución de una cantidad ovocitaria suficiente para que posteriormente se pueda realizar una transferencia embrionaria adecuada (Oktay K et al., 2003).

- Preservación social femenina de la fertilidad

La preservación social de la fertilidad es aquella que no tiene que ver con una enfermedad, sino con el hecho de posponer la maternidad. Hoy en día, el retraso de la maternidad es algo de completa actualidad ya que, según el Instituto Nacional de Estadística, la edad media española a la que se tiene el primer hijo supera los 32 años, lo que afecta de manera significativa a la capacidad reproductiva de la mujer. El trabajo, los problemas económicos o simplemente el hecho de no encontrar una pareja adecuada, hace que cada vez más mujeres retrasen la edad en la que se comienza a buscar el primer hijo. En este punto, hay que tener en cuenta que la edad de la mujer es uno de los factores más influyentes en la reserva ovárica y existe una relación inversamente proporcional entre ambas (a mayor edad, menor es la cantidad y la calidad de los ovocitos) (García-Velasco JA et al., 2013). La mujer nace con una dotación ovárica finita (aproximadamente un millón de ovocitos) y, es en la pubertad, donde esta cantidad comienza a reducirse considerablemente (hasta 400.000-500.000 ovocitos), aunque es a partir de los 35 años cuando desciende de forma muy brusca, tanto en el número como en la calidad de los ovocitos, ya que aumenta el número de ovocitos y embriones con alteraciones cromosómicas, lo que genera una mayor probabilidad de aborto y de tener un niño genéticamente enfermo (Man L et al., 2022). Con el paso del tiempo, la infertilidad relacionada con la edad va a ser más común (no podemos actuar en contra de este proceso biológico) y, por lo tanto, la preservación social

de la fertilidad va a permitir a mujeres fértiles sin deseos de ser madres en ese momento, la posibilidad de ser sus propias donantes en un futuro.

- Optimización de los ciclos de FIV

La vitrificación de ovocitos permite planificar mejor los ciclos de FIV, ya que permite acumular ovocitos en aquellas pacientes que son bajas respondedoras (se vitrifican los ovocitos obtenidos tras varias estimulaciones ováricas). Además, la vitrificación de ovocitos también permite vitrificar ovocitos de donante para que posteriormente una paciente que los necesite pueda utilizarlos sin tener que sincronizar a la donante con la receptora de los ovocitos.

- Preservación femenina de la fertilidad por motivos médicos

Hoy en día existen diversos motivos por los cuales se acude a la preservación médica de la fertilidad de la mujer: pacientes con cáncer, pacientes que van a ser sometidas a un trasplante de médula ósea o de células madre, enfermedades hematológicas y autoinmunes, síndrome de Turner u ooforectomía por tumores ováricos benignos, malignos o endometriomas. El cáncer es la indicación más frecuente para preservar la fertilidad en la mujer y para tratarlo es necesario a veces ciertos tipos de cirugías que pueden resultar en la extirpación de órganos necesarios para lograr un embarazo y tratamientos como radioterapia y quimioterapia que pueden alterar los niveles hormonales femeninos o causar daño en los óvulos de una mujer (Dreyfuss J et al., 2023). Estos tratamientos de radioterapia y quimioterapia provocan muy comúnmente en la mujer:

- Una disminución natural en el número de ovocitos. Esta pérdida de ovocitos funcionales depende de factores como la edad en el momento de la enfermedad, el tipo de cáncer, el tratamiento médico utilizado, la dosis y el número de ciclos de quimioterapia o radioterapia que se necesitan para tratar la enfermedad.

- Una disminución de la calidad y cantidad ovocitaria, independientemente de que la paciente no pierda la función ovárica.

- Un fallo ovárico precoz el cual conlleva el cese de la función reproductiva y hormonal. Además, se ha demostrado que, a mayor edad, la dosis de quimioterapia

necesaria para producir ese daño gonadal irreversible es menor (Bines J et al., 1996).

Estos efectos hacen que algunas mujeres pierdan su fertilidad durante el tratamiento, lo que puede ser temporal o permanente y por ello, se recurre en muchos casos a la vitrificación de ovocitos como método de la preservación de la fertilidad por razones médicas.

Antes de llevarse a cabo el protocolo de vitrificación (la indicación por la cual se vaya a vitrificar no afecta al proceso), la paciente tiene que someterse a una estimulación ovárica y posteriormente a una punción folicular bajo anestesia donde el ginecólogo procede a la extracción de los ovocitos. Estos ovocitos extraídos se deben decumular (eliminación de las células de la granulosa) a las dos horas post-punción. Una vez decumulados se seleccionan los ovocitos que sean maduros (metafase II), es decir, aquellos en los que se observa una estructura denominada corpúsculo polar. Esta estructura nos informa que el ovocito debe alcanzar, igualmente, una maduración citoplasmática adquiriendo factores que van a permitir que la fecundación y el desarrollo embrionario subsiguiente se produzca normalmente. Todos los procesos realizados en una clínica de reproducción asistida deben seguir una correcta trazabilidad con un sistema de "witnessing" o testigo llamado Matcher. Se trata de un sistema electrónico que protege a todas las clínicas y a sus trabajadores del riesgo de error en la identificación de pacientes y muestras durante el tratamiento al que se estén sometiendo.

## ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA

La estimulación ovárica controlada (EOC) es el primer paso para poder llevar a cabo la vitrificación de ovocitos. La finalidad de este proceso es lograr la maduración de varios folículos a la vez en los ovarios y así conseguir aumentar el número de ovocitos para vitrificar. Esta EOC pretende imitar lo que ocurre en el ciclo menstrual natural, pero a mayor escala y se lleva a cabo en tres fases que se caracterizan por la administración de fármacos diferentes:

- Supresión hipofisaria: se administran análogos de la GnRH con la finalidad de hacer un bloqueo del flujo hormonal interno entre la hipófisis y los ovarios. De esta manera no hay producción endógena de gonadotropinas (FSH y LH) y los ovarios se mantienen en reposo (Obed Carmona Ruiz I et al., 2020).

- Desarrollo folicular múltiple: una vez bloqueada la hipófisis, es necesario administrar gonadotropinas exógenas (existen múltiples variantes como son Gonal-f, Puregon, Menopur, Pergoveris, Elonva, etc) para conseguir un desarrollo folicular controlado; lo que se pretende es sincronizar toda la cohorte de folículos y que crezcan todos a la vez, hasta conseguir un tamaño adecuado (Obed Carmona Ruiz I et al., 2020).
- Maduración folicular final: esta fase consiste en una inyección final de un fármaco que contiene hormona hCG (Ovitrelle) para que los óvulos que hay en el interior de los folículos completen su maduración (tamaño de 17-19 mm) (Obed Carmona Ruiz I et al., 2020).

La duración de la estimulación ovárica depende de muchos factores, sobre todo, de la respuesta de la mujer a la medicación hormonal y de si los folículos crecen correctamente. En general, la fase de desarrollo folicular múltiple tiene una duración de unos 10 días aproximadamente. No obstante, la duración total del ciclo va a depender del tipo de protocolo que indique el ginecólogo:

- Protocolo corto: se utilizan antagonistas de la GnRH (Cetrotide y Orgalutran) para la supresión hipofisaria, los cuales tienen un efecto inmediato tras su administración. Por tanto, el número de inyecciones necesarias es menor.
- Protocolo largo: se utilizan agonistas de la GnRH (Decapeptyl, Procrin y Synarel), los cuales deben empezar a administrarse en el ciclo menstrual previo de la mujer (alrededor del día 21 del ciclo), ya que tardan más en conseguir el bloqueo completo de la hipófisis.

Durante todo este proceso, la paciente debe acudir a consulta, teniendo en cuenta el día del ciclo menstrual en el que se encuentra (cada dos días aproximadamente), para hacerse controles hormonales y ecográficos y comprobar si el crecimiento folicular es el adecuado. En función de la respuesta ovárica, el ginecólogo puede ajustar la dosis de medicación hormonal y los días de tratamiento. Finalmente, cuando la mayoría de los folículos hayan alcanzado un tamaño de entre 16-18 mm y se hayan controlado los niveles

de estradiol, el ginecólogo programará la punción folicular para obtener los ovocitos. 36 horas antes de la punción, las pacientes se deben realizar una inyección de la hCG para inducir la ovulación.

## PUNCIÓN FOLICULAR

La punción folicular se trata de una intervención quirúrgica realizada por el ginecólogo cuyo objetivo es la obtención de los ovocitos del interior de los folículos del ovario. Es un proceso sencillo y de corta duración que se realiza bajo sedación. Los ovocitos se extraen cuando el tamaño folicular observado en los controles ecográficos se encuentra aproximadamente en 18 mm, ya que se considera que esos folículos van a contener ovocitos maduros los cuales van a permitir la fecundación. Una vez que la paciente se encuentra sedada en el quirófano, se procede a la aspiración folicular. Posteriormente, los tubos que contienen el líquido folicular son trasladados al laboratorio, manteniendo en todo momento la temperatura adecuada. Serán los embriólogos los que analizarán ese líquido folicular en busca de los ovocitos los cuales más tarde serán decumulados para así poder seleccionar aquellos que se encuentren en un estadio de metafase II, es decir, ovocitos maduros los cuales habrán alcanzado la metafase de la segunda división meiótica y habrán extruído el primer corpúsculo polar.

## VITRIFICACIÓN

Durante los últimos años, se ha intentado modificar el protocolo de vitrificación con el fin de optimizar los resultados en la vitrificación de ovocitos. El conocer todas las variables implicadas en este proceso ha permitido conseguir los protocolos de vitrificación con los que contamos hoy en día. La probabilidad y el éxito de la vitrificación viene determinado por el balance entre la velocidad de enfriamiento y calentamiento en la desvitrificación, la viscosidad la cual depende de los CPAs y el volumen de la solución. Por este motivo, para conseguir una mayor probabilidad de éxito en la vitrificación, la estrategia más utilizada como veremos más adelante consiste en el aumento de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, disminución del volumen de la solución y disminución de la cantidad de CPAs utilizados en el proceso (Saragusty J et al., 2011). Después de haber obtenido los ovocitos y de haber seleccionado aquellos que se encuentran en metafase II después de la decumulación, se procede a la vitrificación. Actualmente y como veremos más adelante, el método por el cual se lleva a cabo la vitrificación es el Cryotop® con el cual se consiguen elevadas velocidades de

enfriamiento y calentamiento (desvitrificación). Este sistema consiste en un mango de plástico al que va unida una pequeña tira transparente en la cual queda adherido el ovocito después de haber sido tratado con las sustancias crioprotectoras. Para llevar a cabo el proceso de vitrificación se utilizan 3 medios diferentes: BS, ES y VS (de menos a más cantidad de agentes crioprotectores de la fabricación comercial Kitazato, Tokio, Japón)

1. En primer lugar, el ovocito entra en contacto con el BS (solución básica) y comienza a sufrir un proceso de deshidratación (se vuelve más pequeño y con el contorno más irregular).
2. Después se pasa el ovocito al medio ES (solución de equilibrio) (más cantidad de CPAs que el BS). En este momento el ovocito continúa realizando el intercambio entre el medio interior y el exterior formado por CPAs.
3. Más tarde, se pasa el ovocito a otra gota de ES (último paso antes de colocarlo en el Cryotop). En este punto, la zona pelúcida y el espacio perivitelino tienen más o menos el mismo grosor.
3. En este paso, se traslada el ovocito del ES al VS (solución de vitrificación) (medio que más CPAs contiene) donde tiene que estar muy pocos segundos (alrededor de 50) ya que como hemos dicho anteriormente, los CPAs son sustancias tóxicas para los ovocitos. En este punto es donde los ovocitos van a perder todo el contenido acuoso y va a ser sustituido por agentes crioprotectores.
4. En el último paso, se carga el Cryotop® con el ovocito (se vitrifican hasta un máximo de 4 ovocitos por Cryotop®) y con la mínima cantidad de medio posible. Una vez cargado el Cryotop®, se sumerge rápidamente en el nitrógeno líquido, se coloca el capuchón del Cryotop® y se introduce en la posición asignada del CBS hasta que sea necesario su uso. El CBS es un banco de vapor de nitrógeno de gametos y embriones que se encuentra a -196°C (CBS V1500, Custom Biogenic Systems, Michigan, EE.UU).

## DESVITRIFICACIÓN

Una vez que se han vitrificado los ovocitos, cuando estos sean necesarios para cualquier ciclo de reproducción asistida, se procede a la desvitrificación.

En el proceso de desvitrificación se utilizan 3 medios: TS (solución de desvitrificación), DS (solución de dilución) y WS (solución de lavado) (de mayor a menor cantidad de CPAs).

1. Se retira el Cryotop® o los Cryotops® (según el número de ovocitos que vayan a ser necesarios) con los ovocitos correspondientes del CBS y se introducen en una bañera que contiene nitrógeno líquido a -196°C.
2. Se quita el capuchón del Cryotop® y se introduce en el TS, solución la cual ha estado previamente (una hora) a 37°C (los ovocitos se despegan fácilmente).
3. Se trasladan los ovocitos al DS y más tarde al WS (todos estos procesos conllevan un intercambio del contenido acuoso del interior del ovocito y los CPAs). Los ovocitos ganan tamaño, es decir, se van hidratando y volviendo a su estado original. Este paso se realiza a temperatura ambiente.
4. Por último, los ovocitos ya desvitrificados y que han sobrevivido se trasladan a una placa con medio de cultivo y se introducen en el incubador (37°C, 6-8% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>) hasta el momento que vayan a ser microinyectados (al menos dos horas).

## ICSI

Una vez que se han desvitrificado los ovocitos que necesitamos, se procede a microinyectarlos con espermatozoides del varón mediante una técnica denominada ICSI. Esta técnica consiste en la microinyección de un espermatozoide, anteriormente seleccionado según su calidad (movilidad y forma), en el ovocito de la mujer. Se inmoviliza el espermatozoide con la pipeta de ICSI y se microinyecta en el ovocito el cual está sujetado con la pipeta holding. Al día siguiente se verá cuáles de esos ovocitos han sido fecundados correctamente. Este proceso se realiza en un microscopio invertido con óptica de Hoffman, dos microinyectores y dos manipuladores.

## CULTIVO Y TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

A partir del momento de la microinyección del ovocito, comienza su incubación y su desarrollo embrionario hasta el momento de la transferencia (se realiza en el día 5 o día 6). Durante este proceso, se va controlando cómo se desarrolla el embrión y si lo hace de una forma normal:

- Día 1: tras la unión del óvulo con el espermatozoide, la información genética de ambos gametos se reorganiza formando un nuevo núcleo celular compuesto por 46 cromosomas. En este proceso se forma el embrión, denominado en sus primeros días cigoto, y mide aproximadamente 0,15 milímetros.
- Día 2: comienza la división celular del cigoto. Primero se divide en dos células y luego cada una de ellas en otras dos hasta llegar a 4 células.
- Día 3: las divisiones continúan hasta alcanzar las 8 células. En este momento se evalúa la calidad de los embriones, ya que no todos ellos serán capaces de desarrollarse correctamente, y se seleccionan los mejores para ser transferidos al útero materno.
- Día 4: las divisiones continúan aumentando el número de células y al mismo tiempo se unen entre ellas para formar lo que denominamos mórula (llamado así por su parecido con una mora). Este proceso se denomina compactación celular y es fundamental para que las células, que hasta ahora se han dividido sin relacionarse entre sí, comiencen a establecer conexiones entre ellas y les permita el siguiente paso fundamental en la evolución embrionaria: la formación del blastocisto.
- Día 5 y 6: si el desarrollo es correcto, entre el día 5 y el día 6 el embrión debe alcanzar el estadio de blastocisto. Una vez que se forma la mórula en día 4, las células empiezan a tener conexión entre ellas y esto les permite no solo seguir dividiéndose y aumentando el número de células hasta unas 100, sino que se redistribuyan en dos grupos. Un grupo de células se reparte por toda la periferia formando una esfera denominada trofoectodermo (fundamental durante el



proceso de implantación en el endometrio uterino) y otras forman una masa muy compacta unida al trofoectodermo denominada Masa Celular Interna (MCI) que dará lugar al futuro embrión.

Actualmente existe un nuevo foco de estudio basado en el desarrollo embrionario una vez que se ha desvitrificado el ovocito y se ha realizado ICSI. Hay que tener en cuenta que la tasa de éxito de la vitrificación radica en la tasa de RNV sano, es decir, no solo implica el proceso de vitrificación y desvitrificación, sino todo el proceso desde el momento que se inicia la EOC hasta el posterior ICSI y transferencia embrionaria. Este foco de estudio está centrado en la Inteligencia Artificial (IA) y en el sistema Time Lapse. En estos últimos años el estudio del embrión para su posterior transferencia a la paciente se realiza utilizando la tecnología Time Lapse la cual permite analizar el desarrollo embrionario completo mediante vídeos, sin sacar los embriones del incubador (Márquez-Hinojosa S et al., 2022), es decir, permite estudiar la cinética embrionaria. De esta manera, se pueden seleccionar los embriones con más probabilidades de implantar y generar un embarazo sin alterar sus condiciones de cultivo. Además, los laboratorios de fecundación in vitro también han apostado por el desarrollo de la IA la cual permite estudiar al embrión a través de algoritmos que evitan tener que manipularlo además de permitir seleccionar el mejor embrión para transferir a la paciente. Esto se realiza por medio de análisis de los parámetros morfocinéticos del embrión. De esta manera se desarrolló, por ejemplo, el sistema KIDScoreD5, el cual analiza y clasifica los embriones automáticamente, aumentando la probabilidad de gestación y embarazo empleando la Inteligencia Artificial (detecta y evalúa todos los pasos del desarrollo del embrión y además clasifica su morfología) (Tartia AP et al., 2022). Esto permite dar lugar a mayores tasas de éxito tras una vitrificación y posterior ICSI. Estas tecnologías afectan directamente a las tasas de éxito de RNV sano ya que las condiciones a las que se encuentran los embriones durante su desarrollo influyen directamente en ese éxito. De todas estas condiciones, también es importante que el laboratorio cumpla con todos los estándares de calidad incluyendo los medios de cultivo y las condiciones ambientales (pH, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y temperatura).

Una vez que se ha observado que el desarrollo embrionario ha ido correctamente y se ha seleccionado el mejor embrión para transferir, se procede a preparar la transferencia embrionaria (último paso de los tratamientos de reproducción asistida). La transferencia

embrionaria consiste en transferir a la paciente el mejor embrión que posea para que éste pueda llevar a cabo la implantación en el endometrio y por consiguiente se consiga el deseado embarazo. Antes de que tenga lugar la transferencia embrionaria, es común que la paciente tenga que someterse a una preparación endometrial para que el endometrio esté listo para implantar (en algunos casos no se realiza esa preparación endometrial, sino que se sigue el propio ciclo hormonal natural de la paciente). Existen dos tipos de transferencia embrionaria actualmente: SET (transferencia de un único embrión) y DET (transferencia de dos embriones). Actualmente la que se lleva a cabo en la mayoría de los casos es el SET. A los 10-15 días de la realización de la transferencia embrionaria, la paciente sabrá mediante un control hormonal de hCG, si ha logrado el embarazo.

Por tanto, la vitrificación de ovocitos es una técnica de completa actualidad debido a la gran cantidad de mujeres que acuden a la clínica con la necesidad de vitrificar sus ovocitos bien sea por razones médicas que así lo recomienden o porque desean postergar su maternidad sabiendo que, en un futuro, y si ellas así lo deciden, podrán ser madres. Debido a este gran auge, es una técnica que está en continuo estudio y mejora.

En este estudio vamos a realizar una revisión crítica y actualizada de los resultados que ofrece la vitrificación de ovocitos en función de estudios realizados con anterioridad, analizando si existen diferencias en las tasas de éxito de FIV entre un ciclo de ovocitos en fresco y un ciclo de ovocitos vitrificados. Más adelante, se revisarán los resultados que ofrece el método Cryotop®, el más utilizado hasta el momento en la vitrificación de ovocitos. También se analizarán las ventajas y desventajas de los sistemas abiertos y cerrados y, por último, se desarrollarán las perspectivas futuras y los avances actuales de la técnica de vitrificación para aquellas pacientes que deseen preservar su fertilidad por razones médicas o no médicas.

## **OBJETIVOS**

- Realizar un análisis completo del proceso de vitrificación de ovocitos y cómo se ha ido mejorado a lo largo de los años comparando si existen diferencias significativas en los resultados de FIV entre ovocitos frescos y ovocitos vitrificados.

- Conocer cuáles son los resultados del método Cryotop® en la vitrificación de los ovocitos y si la concentración de CPAs afecta a los resultados obtenidos.
- Averiguar si existen diferencias entre la vitrificación con un sistema abierto frente a un sistema cerrado.
- Describir las perspectivas futuras y los avances actuales de la técnica de vitrificación de ovocitos.

## **MÉTODOS**

Desde que se logró el primer RNV sano por congelación de ovocitos (congelación lenta) en Australia en 1986 (Chen C, 1986), se han hecho multitud de avances en el campo de la criopreservación de ovocitos.

Fue el 20 de junio de 1999 cuando se reporta el primer caso de nacimiento tras la utilización de un sistema de vitrificación de ovocitos abierto (se expone la muestra directamente a nitrógeno líquido). Nace una niña sana a las 37 semanas de gestación resultado de una donación de ovocitos a su madre de 47 años. Se vitrificaron 17 ovocitos de 4 pacientes distintas y tras la desvitrificación, sobrevivieron 11 ovocitos. Esos 11 ovocitos fueron inyectados mediante ICSI y fecundaron 5. Más tarde se realizó la transferencia embrionaria de 3 embriones sanos a tres pacientes distintas. Dos de esas pacientes eran las donantes originales y ninguna resultó embarazada tras la transferencia. La tercera paciente, receptora de 47 años que, tras varios problemas de infertilidad, se acogió al programa de donación de ovocitos. El embarazo de la receptora de 47 años fue completado con éxito y fue un resultado clave para que en ese momento se siguiesen explorando los beneficios potenciales de la vitrificación para la criopreservación de ovocitos humanos, ya que el éxito de la congelación convencional lenta era relativamente bajo (Kuleshova et al., 1999). A raíz de estos resultados, la técnica de vitrificación de ovocitos fue evolucionando de una manera rápida debido a que se comenzaron a realizar multitud de estudios biológicos que aliviaron las preocupaciones que generaba esta técnica, relacionadas con la eficacia y la seguridad del proceso.

Actualmente y en la mayoría de los casos, la vitrificación de ovocitos tiene lugar mediante un sistema denominado Cryotop® el cual consiste en una tira fina de película transparente conectada a un mango de plástico resistente al nitrógeno líquido. Su diseño permite la carga de muestras para vitrificación con un volumen mínimo de 0,1 µl, un factor que se ha demostrado que es diferenciador para lograr las mejores tasas de supervivencia. Su eficacia se ha demostrado en muchos artículos publicados, pero fue en 2005 cuando Kuwayama demostró su gran eficacia. En este estudio se realizaron dos experimentos que comparaban diferentes métodos de vitrificación de ovocitos (Kuwayama et al., 2005ab). En el primer experimento se utilizaron ovocitos bovinos que se vitrificaron de 3 formas diferentes (tabla 1):

**1. Método ISD (in-straw dilution):** vitrificación en pajitas de plástico de 0,25 ml seguida de una dilución en pajita después del calentamiento.

**2. Método OPS (open-pulled straw):** vitrificación en pajitas abiertas.

**3. Método Cryotop®:** vitrificación en 0,1 µl de medio sobre la superficie de una tira fina de polipropileno especialmente construida unida a un mango de plástico.

Método de vitrificación	Volumen de la solución (µl)	Velocidad de enfriamiento (°c/min)	Velocidad de calentamiento (°c/min)
ISD	25,0	4460	1300
OPS	1,5	16340	13900
CRYOTOP	<0,1	22800	42100

**TABLA 1.** Comparación de los volúmenes y de las velocidades de enfriamiento/calentamiento de los diferentes métodos de vitrificación que se compararon en este estudio (Kuwayama et al., 2005ab).

En el segundo experimento, se vitrificaron ovocitos humanos de 67 pacientes con edades en torno a los 32 años de media las cuales se sometieron a EOC. La vitrificación de estos ovocitos tuvo lugar mediante la técnica que mejores resultados generó en el anterior experimento (el método Cryotop®) y también se compararon los resultados

obtenidos según la concentración de etilenglicol y la presencia o ausencia de células del cúmulo sobre la supervivencia de los ovocitos humanos tras la vitrificación.

Después de que Kuwayama demostrase que el sistema del Cryotop® es el más estable y eficiente en cuanto a la vitrificación de ovocitos, como veremos en los resultados, se comparó el desarrollo embrionario obtenido con ovocitos vitrificados mediante Cryotop® y ovocitos frescos obtenidos simultáneamente (Cobo A. et al., 2008). En este estudio se obtuvieron un total de 509 ovocitos obtenidos de 30 donantes diferentes las cuales cumplían los criterios para ser donante (evaluación psicológica, 18-35 años, historial médico, adicciones, historial médico y reproductivo, cariotipo normal, examen físico y ginecológico, antecedentes familiares y ETS). Todas estas donantes se sometieron a un protocolo de EOC. Además, todos los ovocitos de una misma donante fueron donados a una única receptora compatible y los ovocitos se designaban de manera aleatoria a cada uno de los dos grupos: ovocitos vitrificados u ovocitos frescos.

Los ovocitos que eran para vitrificar estuvieron vitrificados al menos una hora y luego fueron sometidos al proceso de desvitrificación. Mientras esto sucedía, los ovocitos frescos se encontraban en medio de cultivo para que, de esta manera, el ICSI se realizara de manera simultánea en ambos grupos de ovocitos.

La transferencia embrionaria se realizó en el día 3 y los que no se transferían ese día, se transferían el día 5 o el día 6. Los embriones derivados de ovocitos vitrificados se transfirieron con preferencia a los embriones derivados de ovocitos frescos y se vitrificaron un total de 231 ovocitos.

Después de demostrar con resultados sólidos la eficacia de la vitrificación de ovocitos como método de criopreservación ovocitaria, se plantea la pregunta de si puede existir un riesgo potencial de contaminación de las muestras a través de las partículas contenidas en el nitrógeno líquido cuando se usan los sistemas abiertos (durante el proceso de vitrificación, la muestra entra en contacto directo con el nitrógeno). Actualmente se estudia la eficacia del uso de sistemas cerrados que aíslan la muestra y evitan ese contacto con el nitrógeno. En 2022 se realizó un metaanálisis con un total de 17 estudios prospectivos publicados en la literatura. La población de estudio se encontraba formada por ovocitos frescos o vitrificados sometidos a ICSI. Además, se realizó una comparativa del tipo de sistema de vitrificación empleado (sistema abierto o sistema cerrado) y ovocitos frescos. La primera medida que se realizó fue la tasa de

detención del desarrollo por ovocito MII vitrificado antes de alcanzar la tasa de división o blastocisto. La segunda medida que se realizó fue la tasa de fecundación por ovocito MII vitrificado y la tasa de detención del desarrollo por cigoto 2PN. También se realizó un análisis de subgrupos según la etapa de detención del desarrollo. Por último, se utilizó el P-score para clasificar la eficiencia entre los ovocitos frescos y los vitrificados empleando el sistema abierto y el sistema cerrado (Pantou U et al., 2022).

Los resultados de los diversos estudios presentados anteriormente se verán en el siguiente apartado.

## **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos por Kuwayama en el primer experimento con ovocitos bovinos dio luz al sistema Cryotop® para la vitrificación de ovocitos ya que la mayor tasa de supervivencia la obtuvo con el método Cryotop®. El 59,5% de los 153 ovocitos vitrificados con el método Cryotop® se dividieron y el 22,9% de ellos se desarrollaron hasta llegar al estadio de blastocisto. Este resultado se comparó con el 5,3% de ovocitos que llegaron a blastocisto con el método ISD y con el 7,4% de ovocitos que llegaron a blastocisto con el método OPS. Por tanto, con este experimento se demostró la alta eficacia que tiene la vitrificación de ovocitos con el método Cryotop® frente al método ISD y OPS (tabla 2).

Método de vitrificación	Nº de ovocitos tratados	Nº de ovocitos que sobrevivieron	Nº ovocitos divididos tras ICSI	Nº de blastocistos formados
<b>IDS</b>	152	144 (94,7%)	60 (39,5%)	8 (5,3%)
<b>OPS</b>	149	143 (96,0%)	71 (47,7%)	11 (7,4%)
<b>CRYOTOP®</b>	153	148 (96,7%)	91 (59,5%)	35 (22,9%)
<b>OVOCITOS FRESCOS</b>	152	-	118 (77,6%)	68 (44,7%)

**TABLA 2.** Resultado del desarrollo de los ovocitos bovinos después de la vitrificación y del ICSI (Kuwayama et al., 2005ab).

Se observó que los ovocitos vitrificados en una concentración menor (5 mol/l) de etilinglicol tenían mayor tasa de supervivencia y una mayor tasa de morfología normal que los ovocitos vitrificados en una concentración mayor (6,8 mol/l). También se observó que existía una mayor tasa de supervivencia cuando el ovocito estaba rodeado de células del cúmulo que cuando no se encontraban rodeados de las células del cúmulo (tabla 3). Por tanto, los mejores resultados se obtuvieron con ovocitos rodeados de las células del cúmulo vitrificados en 5 mol/l de etilinglicol mediante el método Cryotop®. De los 64 ovocitos que se vitrificaron de esta manera, el 90,6% parecían haber sobrevivido después de la desvitrificación. Además, después del ICSI el 81% se dividió hasta 4 células y el 50% de esos 64 ovocitos iniciales alcanzaron la etapa de blastocisto. Más tarde, se programaron y se realizaron 29 transferencias embrionarias (una media de 2,2 embriones por transferencia) en los días 2 y 5. Se obtuvieron 12 embarazos (41,3%) de los cuales nacieron 7 hijos sanos y todavía había durante la publicación del artículo 3 embarazos en curso (Kuwayama et al., 2005ab) (tabla 4). En 2007 Kuwayama corroboró sus resultados obtenidos anteriormente y cuando realizó su publicación ya habían nacido más de 50 niños sanos mediante la vitrificación de ovocitos mediante Cryotop® (Kuwayama et al., 2007).

Método de vitrificación	Concentración de CPAs (mol/l)	Presencia de células del cúmulo	Nº ovocitos vitrificados	Nº ovocitos que sobrevivieron	Nº ovocitos no fecundados	Nº de blastocistos formados
<b>Cryotop</b>	6,8	+	33	25 (75,8%)	23	8 (24,2%)
<b>Cryotop</b>	6,8	-	10	3 (30,0%)	2	0
<b>Cryotop</b>	5,0	+	64	58 (90,6%)	52	32 (50,0%)

**TABLA 3.** Comparación de los resultados obtenidos tras la vitrificación de ovocitos humanos con el método Cryotop según las diferentes concentraciones de CPAs (Kuwayama et al., 2005ab).

Día de la transferencia/nº de embriones por transferencia	Nº de transferencia/ nº embriones transferidos	Nº de embarazos	Nº de partos	Nº de embarazos en curso
2 (2)	1 (2)	1 (100%)	0	0
2 (3)	17 (51)	6 (35,3%)	4	1
5 (1)	11 (11)	5 (45,5%)	3	2
<b>Total</b>	29 (64)	12 (41,3%)	7	3

**TABLA 4.** Datos relacionados con las transferencias embrionarias realizadas después de la vitrificación de ovocitos con el método Cryotop®. Se muestran también los datos clínicos (embarazos, embarazos en curso y partos) (Kuwayama et al., 2005ab).

Una vez observados los resultados y demostrado que el sistema Cryotop® es el más eficaz, estable y seguro hasta el momento, se comenzaron a realizar otros estudios comparando la eficacia de la vitrificación de ovocitos frente a la utilización de ovocitos frescos. Los resultados que se obtuvieron fueron bastante claros, a pesar de que la población de estudio se basaba en donantes de ovocitos.

De los 231 ovocitos en MII donados que se vitrificaron, 224 (96,9%) ovocitos sobrevivieron después de la desvitrificación. Esos 224 ovocitos fueron inseminados mediante ICSI y fueron 171 ovocitos (76,3%) los que fecundaron frente al 82,2% de los ovocitos frescos que fecundaron tras el ICSI ( $p > 0,5$ ). Los valores de fecundación anormal y ovocitos degenerados después del ICSI también fueron similares para los ovocitos vitrificados y frescos (tabla 5).

	Vitrificados	Frescos	P valor
<b>Nº ovocitos MII</b>	231 (87,2%)	219 (89,7%)	0,363
<b>Nº ovocitos MI</b>	19 (7,2%)	11 (4,5%)	0,203
<b>Nº ovocitos GV</b>	15 (5,7%)	14 (5,7%)	0,974
<b>Nº ovocitos supervivientes</b>	224/231 (96,9%)	-	-
<b>Nº ovocitos inyectados</b>	224	219	-



<b>N° ovocitos fecundados</b>	171 (76,3%)	180 (82,2%)	0,128
<b>N° ovocitos con una fecundación anormal</b>	9 (4,0%)	12 (5,4%)	0,469
<b>N° ovocitos degenerados</b>	7 (3,1%)	6 (2,7%)	0,809

**TABLA 5.** Distribución de los ovocitos, supervivencia y fecundación (Cobo A. et al., 2008).

En el grupo vitrificado, el 94,2% de los cigotos se dividieron el día 2, mientras que para el grupo de los ovocitos frescos la tasa de división de esos cigotos en el día 2 fue del 97,8% ( $p>0,5$ ). Además, la calidad embrionaria en embriones de ovocitos vitrificados fue del 84,4% y en los derivados de ovocitos frescos del 71,5% en el día 2 ( $p<0,5$ ). Para el día 3 de desarrollo embrionario, la tasa de división, el número medio de células y la calidad del embrión fueron similares para ambos grupos. Las tasas de desarrollo de blastocistos fueron casi idénticas también (48,7% y 47,5%) para ovocitos vitrificados y frescos. Además, los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto fueron morfológicamente similares en ambos grupos. También se observó una tasa similar de división en el día 2 (94,2% frente a 97,8%) y en el día 3 (77,6% frente a 84,6%) después de la inyección tanto en ovocitos vitrificados como en frescos, respectivamente. Además, la tasa de desarrollo de blastocistos fue de 48,7% para el grupo vitrificado, similar al 47,5% observado para los ovocitos frescos, lo que demuestra que los ovocitos vitrificados conservan intacto su potencial para llegar al estadio de blastocisto.

Estos investigadores también quisieron evaluar más a fondo la influencia del procedimiento de vitrificación en el desarrollo del embrión y para ello evaluaron la calidad del embrión en estadios temprano y la calidad del blastocisto. En el día 2 la calidad embrionaria evaluada mediante los parámetros morfológicos fue del 84,4% para los ovocitos vitrificados y del 71,5% para los frescos. Aunque estas diferencias sí que son significativas ( $p>0,5$ ), cabe señalar que para el día 3 y el estadio de blastocisto, la calidad embrionaria fue similar entre los dos grupos (80,8% vs 80,5% y 81,1% vs 70% para vitrificado y fresco) (tabla 6).

	Vitrificados	Frescos	p valor
<b>División embriones D2</b>	161/171 (94,2%)	176/180 (97,8%)	0,083
<b>Nº células D2</b>	3,8 +- 1,1	3,9 +- 1,5	0,567
<b>Buena calidad D2</b>	136/161 (84,4%)	126/176 (71,5%)	0,005
<b>División embriones D3</b>	125/161 (77,6%)	149/176 (84,6%)	0,098
<b>Nº células D3</b>	6,9 +- 2,3	6,9 +- 2,7	0,558
<b>Buena calidad D3</b>	101/125 (80,8%)	120/149 (80,5%)	0,956
<b>Nº embriones en cultivo</b>	78	143	-
<b>Nº blastocistos</b>	38/78 (48,7%)	68/143 (47,5%)	0,869
<b>Buena calidad blastocistos</b>	24/32 (81,1%)	42/60 (70%)	0,612

**TABLA 6.** Calidad embrionaria (Cobo A. et al., 2008).

Los resultados clínicos se muestran en la tabla 7. En 23 casos se transfirieron embriones de ovocitos vitrificados, en un solo caso se transfirieron embriones de ovocitos frescos y en cuatro casos se transfirieron embriones tanto de ovocitos frescos como vitrificados (mixtos). La tasa de embarazo por transferencia observada en el grupo vitrificado fue del 65,2%, la paciente que recibió la transferencia del embrión derivado de ovocitos frescos quedó embarazada y dos de las cuatro pacientes que recibieron transferencias mixtas también quedaron embarazadas. La tasa de implantación del grupo vitrificado fue del 40,8% (las embarazadas resultantes de la transferencia mixta no se incluyen en ninguno de los dos grupos). Los datos de embarazo múltiple, aborto espontáneo, embarazo bioquímico y embarazo en curso se muestran en la tabla 7. En la misma tabla se muestra también que para el grupo de vitrificación, se observan dos sacos gestacionales en 5 pacientes (23,8% de embarazo gemelar). Debido a que 3 pacientes (20%) sufrieron abortos espontáneos y en una paciente no se observó saco gestacional (6,6%), la tasa de embarazo en curso fue del 47,8% (Cobo A. et al., 2008). Finalmente se evaluó el potencial de los ovocitos para implantar y lograr embarazos viables. Las tasas

de embarazo e implantación de los ovocitos vitrificados (65,2% y 40,8% respectivamente) son similares a las observadas con ovocitos frescos.

	Vitrificados	Frescos	Mixtos
<b>Nº transferencias</b>	23	1	4
<b>Nº de embriones transferidos</b>	49	2	8
<b>Tasa de embarazo por transferencia</b>	15/23 (65,2%)	1 (100%)	2 (50%)
<b>Tasa de implantación (nº de sacos por nº de embriones transferidos)</b>	20/49 (40,8%)	2/2 (100%)	2/8 (25%)
<b>Tasa de embarazo múltiple</b>	5/15 (23,8%)	1 (100%)	0
<b>Tasa de aborto espontáneo</b>	3/15 (20%)	0	0
<b>Embarazo bioquímico</b>	1/15 (6,6%)	0	0
<b>Embarazo en curso</b>	11/23 (47,8%)	1 (100%)	2 (100%)

**TABLA 7.** Resultados clínicos (Cobo A. et al., 2008).

Tanto el desarrollo embrionario como el resultado clínico obtenido en el estudio demuestra el potencial de la metodología Cryotop® en la vitrificación de ovocitos ya que no se han obtenido resultados significativos de los ovocitos vitrificados frente a los ovocitos frescos. Este método de congelación evita dos de los principales factores que limitaban la criopreservación de ovocitos que son: daños por frío y la formación de cristales de hielo. Las tasas de fecundación no fueron significativamente diferentes entre los grupos como hemos visto anteriormente. Estas observaciones también fueron similares a las obtenidas por otros investigadores con diferentes sistemas de vitrificación (Yoon TK et al., 2003) (Selman H et al., 2006) y por investigadores que utilizan el método

de enfriamiento lento más sacarosa 0,3 M (Borini A et al., 2006). Esto indica que los ovocitos conservan su capacidad de fecundación después de ser criopreservados por todas las estrategias mejoradas. El presente estudio demostró por primera vez el resultado concomitante de ovocitos vitrificados frente a ovocitos frescos, provenientes de la misma cohorte y microinyectados con la misma muestra de semen. Esta comparación también ilustra el potencial tan grande del método Cryotop® para la vitrificación.

Además de este estudio, existen diversos estudios como el de Solé cuyos resultados indican la eficacia de la vitrificación de ovocitos ya que no se encuentran diferencias significativas en cuanto a tasa de fecundación (80,7% en ovocitos frescos frente a 78,2% en ovocitos vitrificados) tasa de embriones en curso (71% en ovocitos frescos frente a 68,2% en ovocitos vitrificados), calidad embrionaria (54,1% en ovocitos frescos frente a 49,8% en ovocitos vitrificados), implantación (33,3% en ovocitos frescos frente a 34% en ovocitos vitrificados), tasa de embarazo múltiple (27,7% en ovocitos frescos frente a 20,8% en ovocitos vitrificados) o RNV (38,4% en las receptoras de los ovocitos frescos frente al 43,4% en las receptoras de los ovocitos vitrificados) (Solé M et al., 2013).

Actualmente y como ya hemos mencionado anteriormente, los investigadores se están planteando la posibilidad de que exista una contaminación debido al contacto de la muestra al vitrificar con el nitrógeno líquido. Los resultados que se obtuvieron sobre el efecto de la vitrificación de ovocitos abierta sobre la detención del desarrollo embrionario por ovocito MII vitrificado al analizar 17 estudios mostraron una alta heterogeneidad. El 81% de los ovocitos vitrificados con el sistema de vitrificación abierto o cerrado presentaron una tasa de detención del desarrollo embrionario estadísticamente mayor en comparación con los ovocitos frescos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el sistema de vitrificación abierto y el sistema de vitrificación cerrado. Además, se realizó un análisis según la etapa de desarrollo donde se había producido la detención embrionaria y se identificó una diferencia estadísticamente significativa en la detención del desarrollo antes de la etapa de escisión al vitrificar. Sin embargo, al analizar la detención del desarrollo antes de la etapa de blastocisto, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la detención del desarrollo al vitrificar. La tasa de fecundación que significativamente menor para los ovocitos vitrificados en comparación con los frescos y respecto a los dos sistemas de vitrificación no se observó

ninguna diferencia estadísticamente significativa. Al comparar la tasa de detención del desarrollo por cigoto 2PN, no se detectó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ovocitos vitrificados y ovocitos frescos o entre los dos sistemas de vitrificación.

## **DISCUSIÓN**

La correcta interpretación de los datos obtenidos al analizar los anteriores estudios con sus correspondientes resultados genera la idea de que la vitrificación de ovocitos con el sistema Cryotop® es el método más seguro y el que ofrece mayores tasas de éxito en cuanto a supervivencia y en cuanto a datos clínicos (desarrollo embrionario, RNV sano en casa, tasa de gestación, implantación y aborto). Esto se debe a que el Cryotop® permite cargar las muestras en un volumen muy pequeño de medio de vitrificación ya que cuando los ovocitos se cargan en el Cryotop®, se elimina casi toda la solución de carga antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Por tanto, el volumen final alcanzando se encuentra en torno a 0,1 µl. Este volumen tan bajo es útil para lograr tasas de enfriamiento extremadamente rápidas (23000 °C/min) y tasas de calentamiento altas (42000 °C/min), evitando así la formación de cristales de hielo los cuales provocan daño celular en los ovocitos. Otra ventaja de este método es que la concentración de CPAs se reduce considerablemente (30%), lo que está demostrado como hemos visto en el estudio anterior, que favorece los resultados de la vitrificación de ovocitos ya que minimizan los efectos potencialmente tóxicos de los CPAs (mayor número de ovocitos que sobreviven después de la desvitrificación y mayor número de blastocistos formados). La principal limitación es que los ovocitos incluidos en todos los estudios son ovocitos donados por mujeres jóvenes y sanas (<35 años) lo que no se identifica con una representación real de la población femenina la cual acude a las clínicas para la vitrificación de ovocitos. Además, no solo se vitrifican ovocitos de donantes, sino que como ya mencionamos anteriormente, existen muchas otras indicaciones por las cuales se vitrifican ovocitos y no siempre son pacientes jóvenes las cuales no poseen ningún problema en cuanto a calidad ovocitaria.

A pesar de los excelentes resultados del sistema Cryotop®, existe una única desventaja que debemos considerar. El Cryotop® es un sistema abierto que plantea problemas de bioseguridad con respecto al riesgo de contaminación cruzada potencial durante su almacenamiento. Hasta el momento, no se han documentado datos de

transmisión de enfermedades infecciosas después de la criotransferencia, no obstante, hay que tener en cuenta el estado en el que se encuentra el nitrógeno líquido y la posibilidad de utilizar un sistema de vitrificación cerrado. Además, actualmente no existen resultados sólidos en cuanto a qué sistema es mejor utilizar (abierto o cerrado) ya que a pesar de que existen varios estudios publicados, los resultados y las opiniones de los expertos son contradictorias. Hasta la actualidad, los ensayos controlados que se han realizado se han basado en sistemas de vitrificación abiertos y, los estudios que comparan ambos sistemas de vitrificación (abiertos vs cerrados) no demuestran unos resultados claros. Los sistemas de vitrificación cerrados podrían evitar la contaminación cruzada existente entre la muestra y el nitrógeno líquido, pero también podría tener una gran desventaja ya que las tasas de enfriamiento que se alcanzan con los sistemas cerrados son mucho menores, lo que podría provocar en el ovocito daños estructurales (Paffoni A et al., 2011). Sin embargo, otros estudios han sugerido que la vitrificación cerrada puede conducir a excelentes resultados clínicos al mismo tiempo que proporciona un entorno aséptico (Papatheodorou A et al., 2013). Por tanto, no existen resultados científicos claros sobre la eficacia de la utilización de sistemas de vitrificación cerrados y, además, los estudios presentados hasta la fecha tienen dos limitaciones principales: el número de artículos revisados es limitado y se identifica una amplia heterogeneidad. Por este motivo, existe una necesidad real de monitorizar esta técnica y analizar las tasas de éxito logradas en todas las clínicas de reproducción asistida.

Actualmente está aumentando en todas las clínicas el número de ciclos de vitrificación de ovocitos y por ello, debería ser un motivo para la realización de futuras investigaciones en este campo. Para ello se debería incluir en los estudios el seguimiento a largo plazo de los niños nacidos después de una vitrificación de ovocitos y también se deberían realizar estudios con ovocitos que no fuesen de donantes para así obtener resultados más sólidos y fiables. En cuanto a los dos sistemas de vitrificación (abierto vs cerrado), se deberían realizar más estudios y especialmente ensayos controlados aleatorios para evaluar los posibles efectos de la vitrificación de ovocitos en el desarrollo embrionario según si se utilizan sistemas abiertos o sistemas cerrados.

En definitiva, la vitrificación de ovocitos ha ganado popularidad ya que mejora la autonomía reproductiva de las mujeres debido a que diversos estudios han demostrado y

evaluado su eficacia. Además, evita las preocupaciones éticas, legales y religiosas que rodean la vitrificación de embriones, haciéndola preferible en muchas situaciones.

Tenemos un gran camino por delante para explorar y estudiar esta técnica tan apasionante que resultará beneficiosa para muchas pacientes en el futuro.

## **CONCLUSIONES**

- La tecnología disponible para la vitrificación de ovocitos ha dado un salto vertiginoso en los últimos años. Gracias a la introducción del sistema de vitrificación basado en el método Cryotop® ha sido posible obtener resultados similares en cuanto a la capacidad de desarrollo de los embriones a partir de ovocitos MII frescos frente a embriones formados a partir de ovocitos MII vitrificados. Tampoco se encuentran diferencias en cuanto a tasa de fecundación, tasa de embriones en curso, calidad embrionaria, implantación, tasa de embarazo múltiple o RNV sano en casa.
- La vitrificación de ovocitos con el sistema Cryotop® es altamente estable, segura y eficaz (demostrada por diversos autores) ya que de esta forma se mantienen intactas las estructuras ovocitarias de la misma manera que el ovocito fresco en su estadio inicial, es decir, la vitrificación de ovocitos no produce ninguna alteración en la estructura ni en el funcionamiento del ovocito. En general, la supervivencia ovocitaria después de la desvitrificación es mayor al 85%
- La concentración de CPAs que se utiliza para el proceso de vitrificación de ovocitos sí que afecta a las tasas de éxito de esta técnica. Una menor concentración de CPAs genera mejores resultados en cuanto al número de ovocitos que sobreviven tras la desvitrificación y en cuanto al número de blastocistos formados. Esto se debe a que los CPAs en grandes cantidades afectan a la estructura del ovocito.
- Respecto a la seguridad del sistema abierto utilizado ampliamente para la vitrificación de ovocitos no hay conclusiones claras. Sí parece que puede existir la posibilidad de una contaminación por parte del nitrógeno líquido al

entrar en contacto con la muestra, pero no se ha demostrado. Los resultados que existen actualmente no demuestran diferencias en las tasas de éxito de la vitrificación con un sistema abierto frente a un sistema cerrado.

- La IA y sistemas como el Time Lapse han permitido aumentar claramente la tasa de éxito de la vitrificación de ovocitos permitiendo seleccionar el mejor embrión a transferir. Aun así, queda un largo recorrido por explorar en cuanto a la técnica de vitrificación de ovocitos.



## **BIBLIOGRAFÍA**

Bines J, Oleske D.M. and Cobleigh M.A. **Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer.** J Clin Oncol, 14 (1996), pp. 1718-1729.

Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C and Coticchio G. **Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration.** Hum Reprod 2006; 21:512–7.

Chen C. **Pregnancy after human oocyte cryopreservation.** Lancet, 1986 Apr 19;1(8486):884-6.

Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, Tsai YY and Yang YS. **Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI.** Hum Reprod. 2005 Jul;20(7):1975-80.

Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A and Remohí J. **Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method.** Fertility and Sterility, 2008; 89 (6):1657-1664,

Dreyfuss J, Sadoun M, Boumerdassi Y, Sritharan N, Eustache F, Sarandi S, Rakrouki S, Vinolas C, Sifer C, Grynberg M and Peigné M. **Cumulative live-birth rate after oocyte vitrification for fertility preservation (FP) in oncologic or benign conditions: a retrospective comparative monocentric study.** Human Reproduction, Volume 38, Issue Supplement\_1, June 2023.

Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martínez M, Carmona L and Pellicer A. **Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications.** Fertil Steril, 2013 Jun;99(7):1994-9.

Jaiswal AN and Vagga A. **Cryopreservation: A Review Article.** Cureus. 2022 Nov 16;14(11):e31564.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S and Kato O. **Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination.** *Reprod Biomed Online* 2005a;11:608-614.

Kuwayama M, Vajta G, Kato O and Leibo SP. **Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes.** *Reprod Biomed Online* 2005b;11:300-308.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A and Trounson A. **Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report.** *Hum Reprod*, 1999 Jun; 14:3077-3079.

Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV and Oktay K. **American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients.** *J Clin Oncol*, 2006 Jun 20;24(18):2917-31.

Man L, Lustgarten Guahmich N, Vyas N, Tsai S, Arazi L, Lilienthal D, Schattman G, Rosenwaks Z and James D. **Ovarian Reserve Disorders, Can We Prevent Them? A Review.** *Int J Mol Sci*, 2022 Dec 6;23(23):15426.

Marina S, Marina F, Torres PJ, Fosas N, Martín P, Alcolea R, Pérez N, Fernández S, Arnedo N, Jové I, Hochman M and Suñol J. **Oocyte freezing for assisted reproduction: Overview.** Vol. 19 - nº 1 - Enero-Febrero 2002. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*.

Martino A, Pollard JA and Leibo SP. **Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence.** *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 503-12.

Márquez-Hinojosa S, Noriega-Hoces L and Guzmán L. **Time-Lapse Embryo culture: A better understanding of embryo development and clinical application.** *JBRA Assist Reprod.* 2022 Aug 4;26(3):432-443.

Oktay K, Buyuk E, Davis O, Yermakova I, Veeck L and Rosenwaks Z. **Fertility preservation in breast cancer patients: IVF and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifen.** *Hum Reprod.* 2003 Jan;18(1):90-5.

- Oktay K, Cil AP and Bang H. **Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis.** Fertil Steril. 2006 Jul;86(1):70-80.
- Obed Carmona Ruiz, I., Saucedo de la Llata, E. and Moraga-Sánchez, M. R. **Estimulación Ovárica Controlada para Inseminación Intrauterina, una revisión.** Rev. iberoam. fertil. reprod. hum, 2020, 0-0.
- Paffoni A, Guarneri C, Ferrari S, Restelli L, Nicolosi AE, Scarduelli C and Ragni G. **Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes.** Reprod Biomed Online 2011;22:292–298.
- Pantou U, Maziotis E, Sfakianoudis K, Grigoriadis S, Kokkini G, Trípidó U, Kokkali G, Asimakopoulos B, Pantos K and Simopoulou M. **The effect of oocyte vitrification accounting for both open and closed systems on embryo developmental arrest rate. A systematic review and network meta-analysis.** Human Reproduction, Volume 37, Issue Supplement\_1, July 2022.
- Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Prapas N, Zikopoulos K, Georgiou I and Prapas Y. **Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study.** Reprod Biomed Online 2013;26:595–602.
- Rall WF and Fahy GM. **Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification.** Nature, 1985 pp. 313-573-5.
- Remohí JA, Cobo AC, Prados N, Romero JL and Pellicer A. **Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana,** 2012.
- Saragusty J and Arav A. **Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification.** Reproduction 2011;141:1-19.
- Selman H, Angelini A, Barnocchi N, Brusco GF, Pacchiarotti A and Aragona C. **Ongoing pregnancies after vitrification of human oocytes using a combined solution of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide.** Fertil Steril 2006;86:997–1000.
- Solé M, Santaló J, Boada M, Clua E, Rodríguez I, Martínez F, Coroleu B, Barri PN and Veiga A. **How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A**

**prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes.** Human Reproduction, Volume 28, Issue 8, August 2013, Pages 2087–2092.

Tartia AP, Wu CQ, Gale J, Shmorgun D and Léveillé MC. **Time-lapse KIDScoreD5 for prediction of embryo pregnancy potential in fresh and vitrified-warmed single-embryo transfers.** Reprod Biomed Online, 2022 Jul;45(1):46-53.

Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM and Cha KY. **Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program.** Fertil Steril 2003;79:1323–6.

## **ANEXO**

# **CRYOTOP<sup>®</sup> SAFETY KIT**

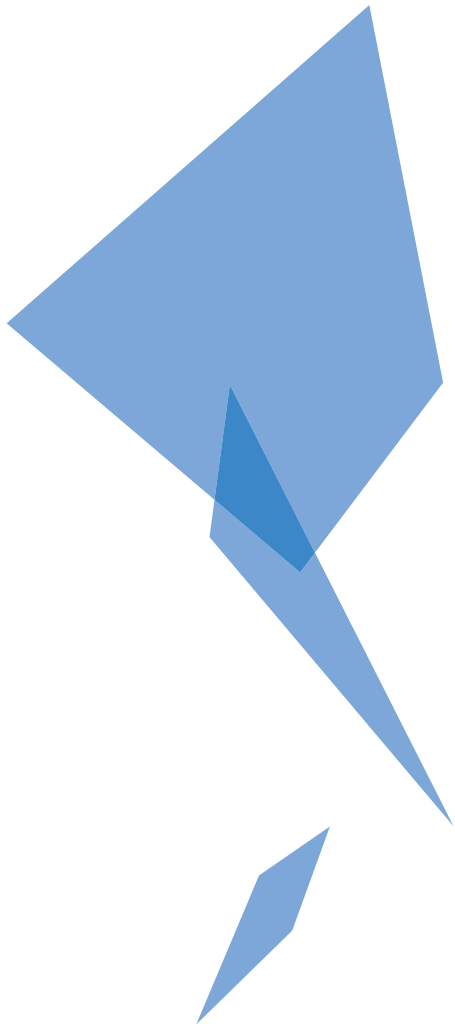
**Vitrification Protocol for Cryotop<sup>®</sup> Method**

**Vitrification Media VT801 / VT802 & VT601 / VT602**

**Cryotop<sup>®</sup> - Open System**

**Cryotop<sup>®</sup> SC - Closed System**

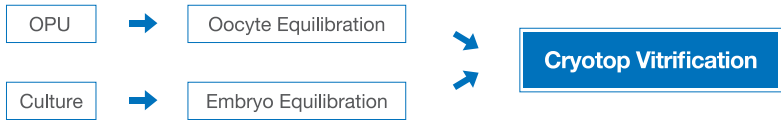




**Vitrification**



### Vitrification Procedure



It is different procedures between Oocyte and Embryo for Equilibration.

## PART 1

# Materials Required

- Vitrification Media VT801 (Ref.91171) or VT601(Ref.91101).
  - No.0 Basic Solution (BS): 1 X 1.5mL vial (Only for Oocyte Vitrification)
  - No.1 Equilibration Solution (ES): 1 X 1.5mL vial
  - No.2 Vitrification Solution (VS): 2 X 1.5mL vials
- Cryotop
  - Cryotop® (Ref. 81111, 81112, 81113, 81114, 81115)
  - Cryotop®SC (Ref. 81121, 81122, 81123, 81124, 81125)
- Repro Plate - K1 (Ref. 83003)
- Cooling Rack (Ref. 84010): Blue styrol box for liquid nitrogen
- Pasteur Pipette **\*\*refer to CAUTION**
- Stereomicroscope (Turn off the heating plate)
- Stopwatch or Timer (with count up function)
- Liquid Nitrogen
- Tweezers
- 2 Micro pipettes: 2-20µL / 100-1000µL
- Cane
- Storage tank

### Additional Materials for Cryotop®SC

- Cooling Rack SC (Ref. 84014)
- Straw Cutter (Ref. 84117)
- Aluminum Block (Ref. 84115)
- Sealer



### CAUTION

Use a pasteur pipette that has a suitable internal diameter for Oocyte or Embryo. The external diameter of Oocyte is about 120µm and for Embryo, about 120-250µm. This is to optimize the volume of the solutions for the best dilution condition to get the highest survival rate.

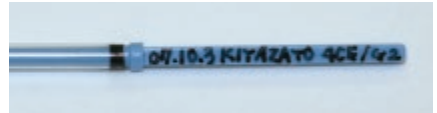
## PART 2

# Preparation for Vitrification

1. Bring **BS**, **ES** and **VS** to room temperature (25-27°C).

2. Write necessary information about a patient on the handle/straw cap of Cryotop (See Figure 2-1). You can also label them.

Figure 2-1

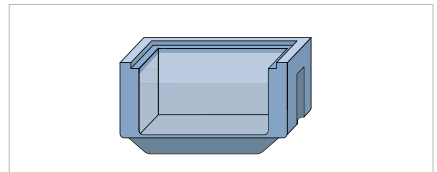


3.

**[Cryotop]**

Fill 90% of Cooling Rack with fresh liquid nitrogen.

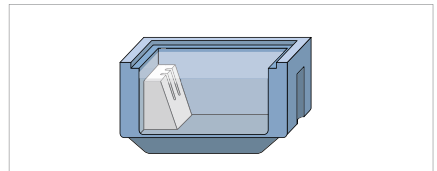
Figure 2-2



**[Cryotop SC for closed system]**

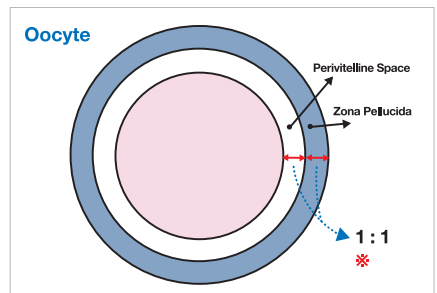
Place Aluminum Block in Cooling Rack SC from the beginning. Then fill with fresh liquid nitrogen until it covers the top of the Aluminum Block (See Figure 2-3).

Figure 2-3



4. Remove the culture dish containing Oocyte or Embryo from the incubator. Check the quality of the Oocyte or the Embryo well with pasteur pipette under the microscope (See Figure 2-4).

Figure 2-4



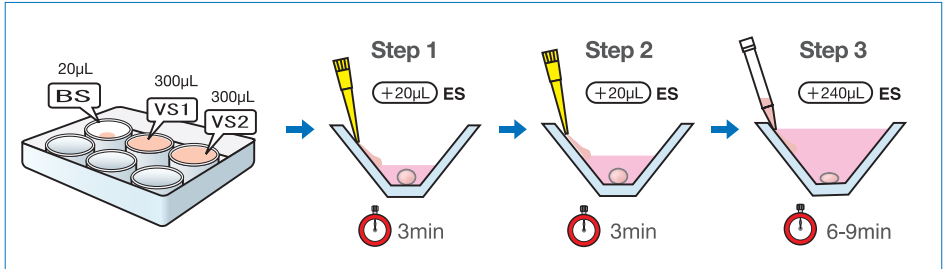
For Oocyte Vitrification, take the cumulus cells off.

※ Compare the width of perivitelline space with thickness of zona pellucida and record it (Ex.1:1). It makes easy to know the completing of the equilibration after immersing in ES.

## PART 3

## Equilibration

## Oocyte Equilibration



## Oocyte Equilibration 1

Write **BS**, **VS1** and **VS2** on the lid of Repro Plate. Drop 20µL for **BS** and 300µL each for **VS1** and **VS2** on the plate with micro pipette (See Figure 3-1). Immediately put the lid on the Repro Plate.

## Oocyte Equilibration 2

Aspirate the Oocyte at the tip of the pasteur pipette. Transfer the Oocyte with minimal volume of medium from the culture dish to the **BOTTOM** of **BS** (20µL).

## Oocyte Equilibration 3 - For 3 minutes

Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps. Add **ES** 20µL gently to the **TOP** of **BS** with the Oocyte moving micro pipette along the well and leave it for 3 minutes (See Figure 3-2).

## Oocyte Equilibration 4 - For 3 minutes

Add another **ES** 20µL gently to the **TOP** of **BS** as well and leave it for 3 minutes (See Figure 3-2).

## Oocyte Equilibration 5 - For 6 - 9 minutes

Add another **ES** 240µL gently to the **TOP** of **BS** and leave it for 6 - 9 minutes (See Figure3-2).

For Equilibration, the volume of Oocyte is required to be recovered completely. Oocyte Equilibration is complete when the width of perivitelline space becomes equal to the width before immersing to ES.

Figure 3-1

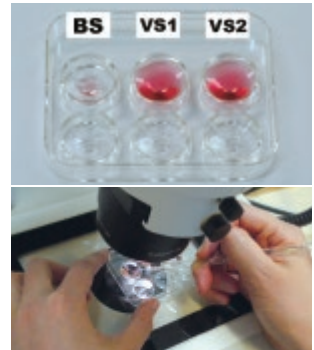
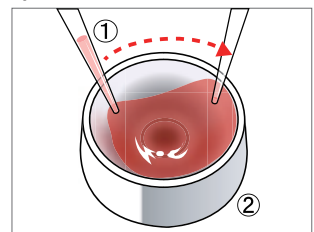
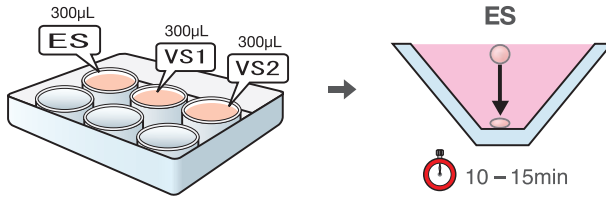


Figure 3-2



## Embryo Equilibration



### Recommendation

2PN , 4-cell or 8-cell: 10 – 12min  
Morula or Blastocyst: 12 – 15min

### Embryo Equilibration 1

Write **ES**, **VS1** and **VS2** on the lid of Repro Plate. Gently invert each vial of **ES** and **VS** twice to mix contents. Drop each solution 300µL on the plate using micro pipette (See Figure 3-3). Immediately put the lid on the Repro Plate.

### Embryo Equilibration 2

Aspirate the Embryo at the tip of the pasteur pipette (See Figure 3-4). Put the Embryo with minimal volume of medium to the **TOP** center of **ES**.

### Embryo Equilibration 3 - For 10 - 15minutes

Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps. The Embryo free-falls within 30 seconds. It spontaneously begins to shrink and then gradually returns to its original size with infiltrating **ES**, which indicates that the Equilibration is complete.

Figure 3-3

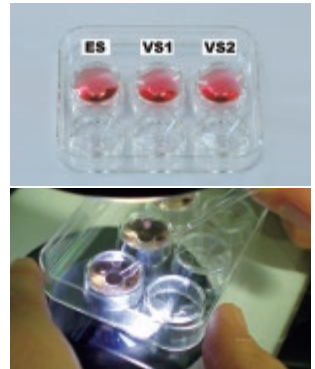
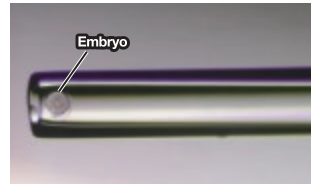


Figure 3-4



### CAUTION

For Blastocyst Equilibration, wait for disappearing of the perivitelline space. Especially, for vitrification of Blastocyst, Day 5 is recommended.

#### Equilibration time is as follows:

Oocyte :	12-15min
2PN , 4-cell or 8-cell :	10-15min
Morula or Blastocyst :	12-15min

It is the same procedure for Oocyte and Embryo.

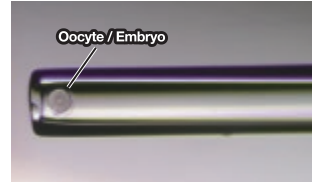
## PART 4

# Vitrification

### Vitrification 1

After the completion of Equilibration, aspirate the Oocyte (Embryo) in **ES** at the tip of pasteur pipette (See Figure 4-1). Transfer the Oocyte (Embryo) to the **surface** center of **VS1** with minimal volume of **ES**. Blow only the Oocyte (Embryo) out to **VS1**. To avoid getting the remaining **ES** in the pasteur pipette into the **VS1**, blow out the **ES** to the outside of the well. Aspirate fresh **VS1** and blow it out again to the outside of the well. Aspirate fresh **VS1** into the pasteur pipette.

Figure 4-1



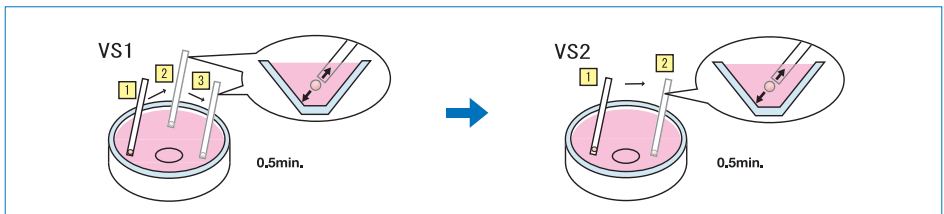
### Vitrification 2 - Within 0.5 minute

Aspirate the Oocyte (Embryo) in **VS1** with the pasteur pipette and blow it out to **VS1**. Quickly stir five times around the Oocyte (Embryo). Repeat the aspirating, blowing out and stirring three times changing the positions in **VS1** (See Figure 4-2). Displace the outer solution of the Oocyte (Embryo) to **VS1** completely until the remaining **ES** visually disappears.

### Vitrification 3 - Within 0.5 minute

Blow out the remaining **VS1** in the pasteur pipette to the outside of the well. Aspirate fresh **VS2** into the pasteur pipette, and then aspirate the Oocyte (Embryo) in **VS1** at the tip of the pipette. Transfer the Oocyte (Embryo) to **VS2** with minimal volume of **VS1**. Stir around the Oocyte (Embryo) changing positions twice with the pasteur pipette in **VS2** (See Figure 4-2). This step is completed when the outer Oocyte (Embryo) is displaced to **VS** perfectly and the flat shrinking in cause of dehydration is observed.

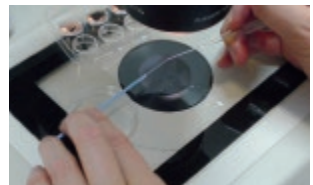
Figure 4-2



### Vitrification 4

Place the Cryotop under a microscope (Logo should be up) and adjust the focus on the black mark of the Cryotop sheet (See Figure 4-3).

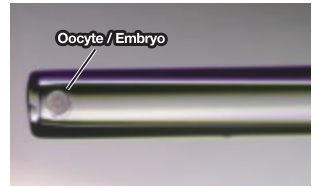
Figure 4-3



## Vitrification 5

Aspirate the shrunk Oocyte (Embryo) in **VS2** at the tip of the pasteur pipette (See Figure 4-4). Place the Oocyte (Embryo) by the black mark of Cryotop sheet with minimal volume (less than 0.1  $\mu$ L) of **VS2** (See Figure 4-5a and 4-5b). For more than 2 Oocytes (Embryos), make 1 droplet for each (See Figure 4-6a and 4-6b).

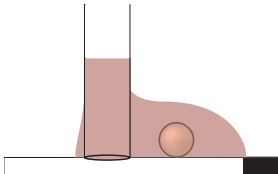
Figure 4-4



## Removal of the excess VS on the sheet

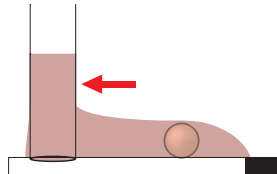
After putting Oocytes (Embryos) on the Cryotop sheet, the excess VS should be removed by aspirating using pipette.

### Step 1



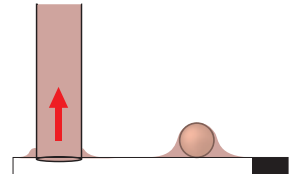
Put the top of the pipette on the bottom end of the big VS drop.

### Step 2



Slide the pipette horizontally to outside, and make the VS drop lower.

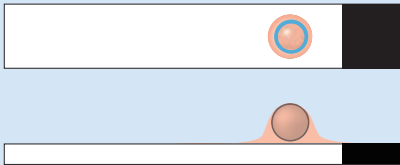
### Step 3



Aspirate the excess VS, and minimize the VS drop (not aspirating oocyte).

Figure 4-5a

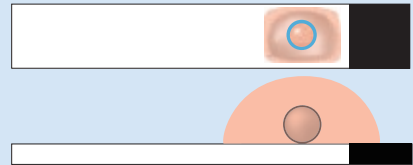
### Good example



Make a planar droplet by the black mark of Cryotop sheet.

Figure 4-5b

### Bad example



Make a steric droplet by the black mark of Cryotop sheet. The volume of VS2 is too much.

Figure 4-6a

### Good example

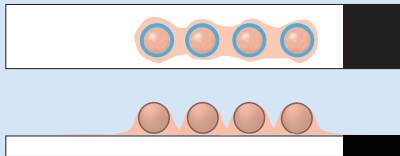
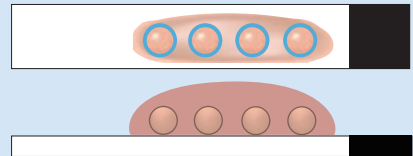


Figure 4-6b

### Bad example



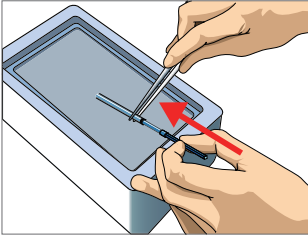
## Cryotop® and Cryotop® SC have different procedures.

### Cryotop® – Open System

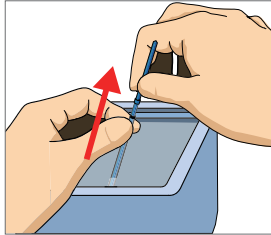
#### Vitrification 6-A

Plunge the Cryotop directly into liquid nitrogen. Hold the straw cap with tweezers and insert the Cryotop from sheet end in liquid nitrogen. Then fit the Cryotop with the straw cap by hands screwing tightly in the air (See Figure 4-7).

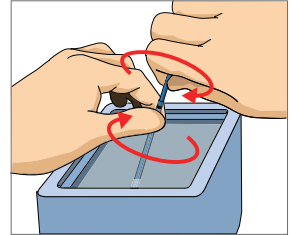
Figure 4-7



Hold the straw cap with tweezers and insert the Cryotop into it.



Hold the straw cap with fingers and fit it.



Twist it and make sure if the straw cap fits tightly to the Cryotop.



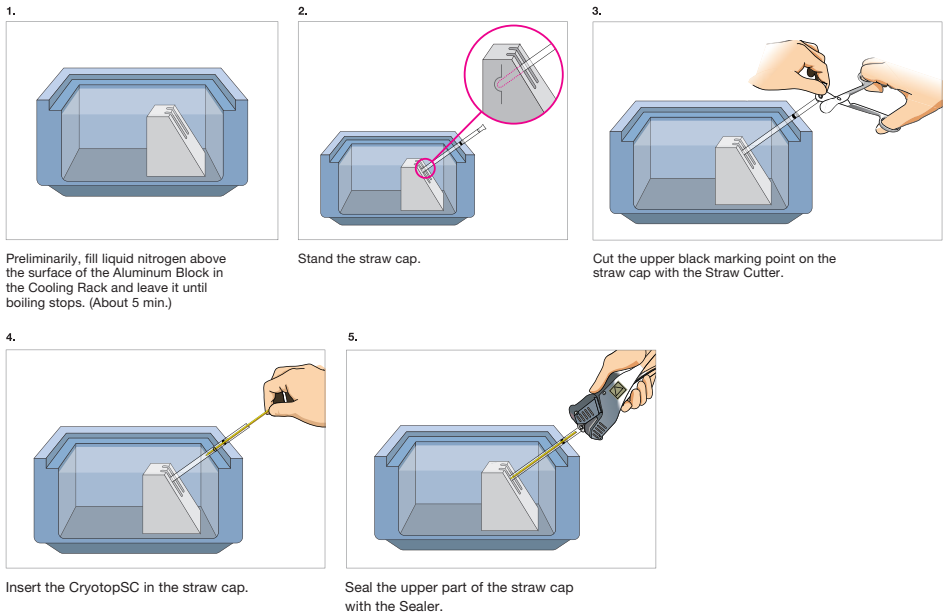
#### CAUTION

Keep the Cryotop sheet in the liquid nitrogen until transferring to a storage tank. In transferring the Cryotop to other storage tank, keep it in liquid nitrogen. Do not expose of the Cryotop in air until Thawing.

## Cryotop®SC – Complete Closed System Vitrification 6-B

Without direct contact with liquid nitrogen, insert the CryotopSC into the straw cap pre-set at the Aluminum Block. Then seal the straw cap (See Figure 4-8).

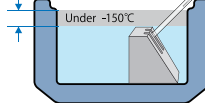
Figure 4-8



### POINT

Lean the upper part of the straw cap against the Cooling Rack. This positioning avoids influence of cool air from liquid nitrogen.

Within 2.5cm



### CAUTION

Keep the CryotopSC in the liquid nitrogen until transferring to a storage tank. In transferring the CryotopSC to other storage tank, keep it in liquid nitrogen. Do not expose of the CryotopSC in air until Thawing.









**Thawing**

## PART 1

# Materials Required

- Thawing Media VT802 (Ref.91182) or VT602 (Ref.91121).  
No.1 Thawing Solution (TS): 2 X 4mL vial  
No.2 Diluent Solution (DS): 1 X 4mL vial  
No.3 Washing Solution (WS): 1 X 4mL vial
- Repro Plate - K1 (Ref. 83003)
- 2 Petri Dish
- Cooling Rack (Ref. 84010): Blue styrol box for liquid nitrogen
- Pasteur Pipette **\*\*refer to CAUTION**
- Stereomicroscope (Turn off the heating plate)
- Stopwatch or Timer (with count up function)
- Liquid Nitrogen
- Tweezers
- 1 Micro pipette: 100-1000 $\mu$ L

### Additional Materials for Cryotop@SC

- Straw Cutter (Ref. 84117)



### CAUTION

Use a pasteur pipette that has a suitable internal diameter for Oocyte or Embryo. The external diameter of Oocyte is about 120 $\mu$ m and for Embryo, about 120-250 $\mu$ m. This is to optimize the volume of the solutions for the best dilution condition to get the highest survival rate.

## PART 2

## Preparation for Thawing

1. Warm **TS** vial (sealed) with a Petri Dish in an incubator to 37°C(>1.5hours).
2. Bring **DS** and **WS** to room temperature (25~27°C).
3. Retrieve the cane which has the specific Cryotop, quickly immerse the cane in a Cooling Rack filled with fresh liquid nitrogen. Retrieve the specific Cryotop from the cane in the liquid nitrogen. Check the information about the patient on the label of Cryotop.

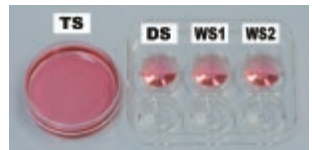
**CAUTION**

Place the Cooling Rack by the stereo microscope.

4. Write **DS**, **WS1** and **WS2** on the lid of a Repro Plate. Gently invert each vial of **DS** and **WS** twice to mix contents. Drop 300µL each for **DS**, **WS1** and **WS2** on the Repro Plate with micro pipette. Place it on the microscope stage and lid it.

Remove **TS** vial and the Petri Dish from the incubator and place the Petri Dish on the microscope stage. Gently invert the vial of **TS** twice to mix contents and pour the full contents into the Petri Dish (See Figure 2-1).

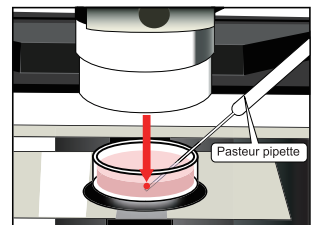
Figure 2-1



5. Adjust the focus of the microscope to the Petri Dish with **TS**.

Use pasteur pipette in order to focus easily on the center of the Petri Dish (See Figure 2-2).

Figure 2-2

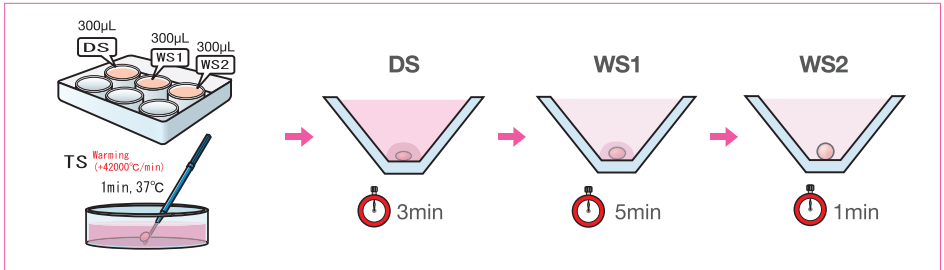


## PART 3

# Thawing

Cryotop® and Cryotop®SC have different procedures.

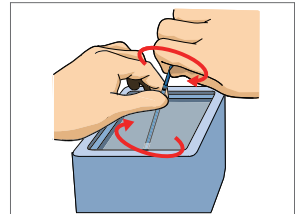
## Cryotop® - Open System



### Thawing 1

Carefully twist and remove the straw cap from the Cryotop in liquid nitrogen (See Figure 3-1). Prop it against the corner of the Cooling Rack.

Figure 3-1



Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps.

### Thawing 2

Be ready to use pasteur pipette keeping the Cryotop in liquid nitrogen. Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps.

### Thawing 3 - For 1 minute

Quickly immerse Cryotop sheet into **TS** on the microscope stage. It should be within 1 second (See figure 3-2). Find the Oocyte (Embryo) adjusting the focus on the black mark of the Cryotop sheet. 1 minute after immersing into **TS**, gently aspirate the Oocyte (Embryo) with the pasteur pipette after dispensing it from the sheet. Aspirate the Oocyte (Embryo) even if it does not dispense from the sheet. Also, aspirate **TS** until the Oocyte (Embryo) reaches 2mm from the tip of the pasteur pipette (See Figure 3-3).

Figure 3-2

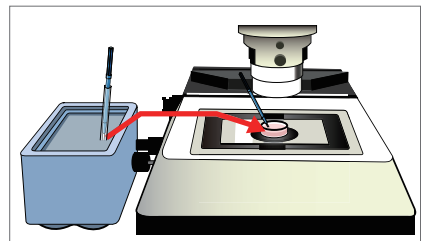
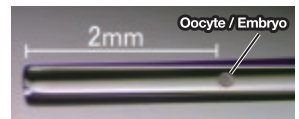


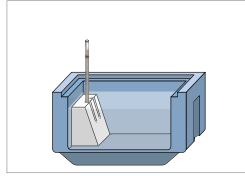
Figure 3-3



## Cryotop® SC Closed System.

### Thawing 1

Stand the CryotopSC on the Aluminum Block.

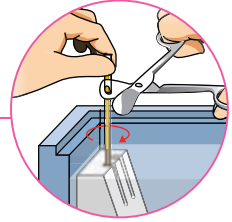
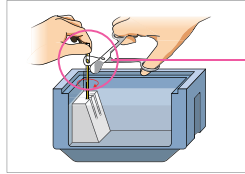


### Thawing 2

Cut the marking point with Straw Cutter.

Put the cutting blade at the black marking point.

Turn the straw cap slowly to cut.



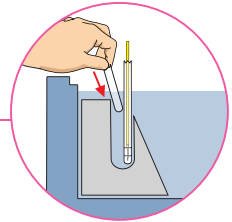
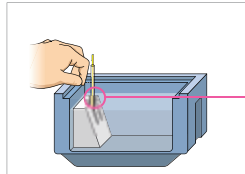
### Thawing 3

Be ready to use pasteur pipette keeping the CryotopSC in liquid nitrogen. Set up the stop watch (with count up function). Check the time with the stop watch for the following steps.

### Thawing 4

Insert the cut piece of the straw cap into the space between the CryotopSC and the Aluminum Block.

This is to take out the CryotopSC easier.



### Thawing 5 – For 1 minute

Quickly immerse the CryotopSC sheet into **TS** on the microscope stage by transferring it linearly. It should be within 1 second (See Figure 3-4). Find the Oocyte (Embryo) adjusting the focus on the black mark of the Cryotop sheet. 1 minute after immersing into **TS**, gently aspirate the Oocyte (Embryo) with the pasteur pipette after dispensing it from the sheet. Aspirate the Oocyte (Embryo) even if it does not dispense from the sheet. Also, aspirate **TS** until the Oocyte (Embryo) reaches 2mm from the tip of the pasteur pipette (See Figure 3-5).

Figure 3-4

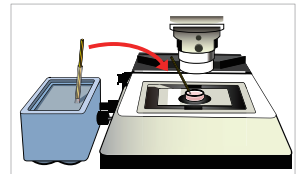
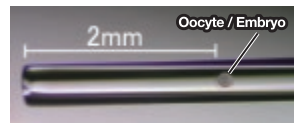


Figure 3-5



## PART 4

# Dilution

### Dilution - For 3 minutes

Blow out only **TS** in the pasteur pipette into the **BOTTOM** center of **DS** slowly (See Figure 4-1a), then gently place the Oocyte (Embryo) on the bottom of the **TS** layer (See Figure 4-1b). Leave it for 3 minutes. This is for mostly gradual displacement from **TS** to **DS**.

Figure 4-1a

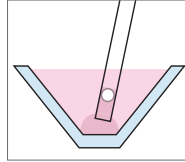
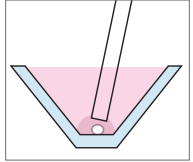


Figure 4-1b





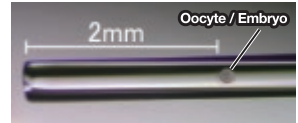
## PART 5

# Washing

### Washing 1 - For 5 minutes

3 minutes later, after immersing into **DS**, gently aspirate the Oocyte (Embryo) in **DS** with the pasteur pipette. Also, aspirate **DS** until the Oocyte (Embryo) reaches 2mm from the tip of the pasteur pipette (See Figure 5-1).

Figure 5-1



Blow out only **DS** in the pasteur pipette into the **BOTTOM** center of **WS1** slowly (See Figure 5-2a), then gently place the Oocyte (Embryo) on the bottom there (See Figure 5-2b). Leave it for 5 minutes. This is also for mostly gradual displacement from **DS** to **WS1**.

Figure 5-2a

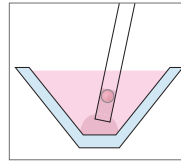
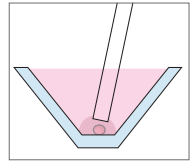


Figure 5-2b



### Washing 2 - For 1 minute

5 minutes later, after immersing into **WS1**, aspirate the Oocyte (Embryo) with minimal volume of **WS1** with pasteur pipette (See Figure 5-3) and transfer it to the **TOP** center of **WS2**. After the Oocyte (Embryo) free-falls to the bottom of **WS2**, do the same work again in **WS2** (See Figure 5-4).

Figure 5-3

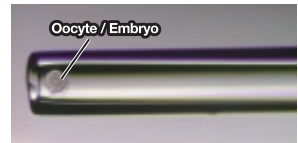
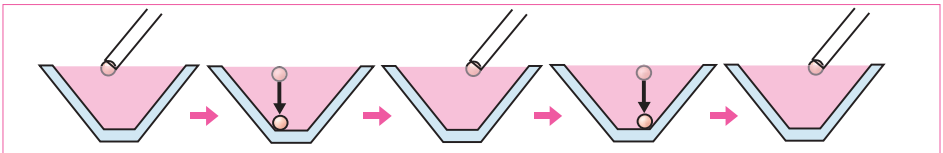


Figure 5-4

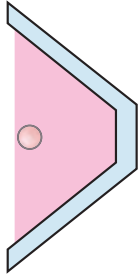


### Washing 3

Transfer the Oocyte (Embryo) to a culture dish containing the appropriate culture medium. Incubate the Oocyte (Embryo) in a 37°C incubator to complete recovery.

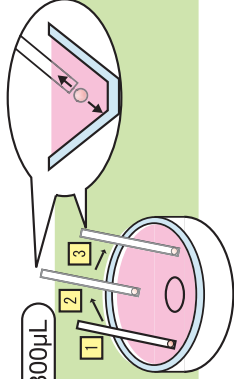
Completion of recovery : Oocyte (Embryo) for 2 hours for recommendation.

**ES** (300µL)



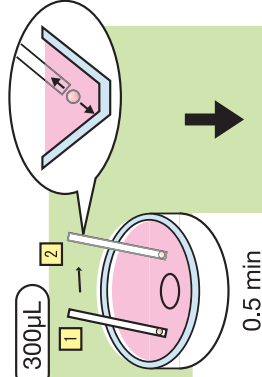
10 – 15min

**VS1** (300µL)



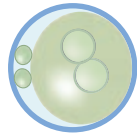
within 0.5 min

**VS2** (300µL)

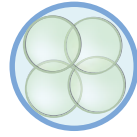


0.5 min

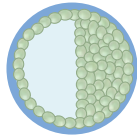
**BEFORE**



Zygote



4 Cell

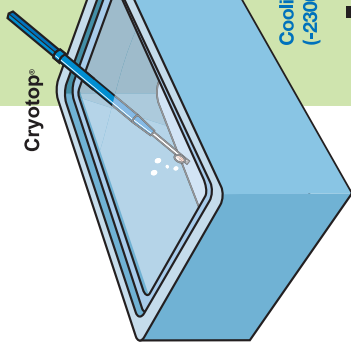


Blastocyst

**AFTER**

# Vitrification Protocol

**Embryo**

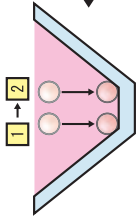


Cryotop®

LN2

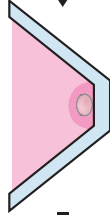
Cooling  
(-23000°C / min)

**WS2** (300µL)



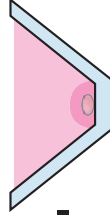
1 min

**WS1** (300µL)



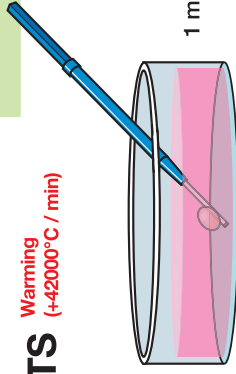
5 min

**DS** (300µL)



3 min

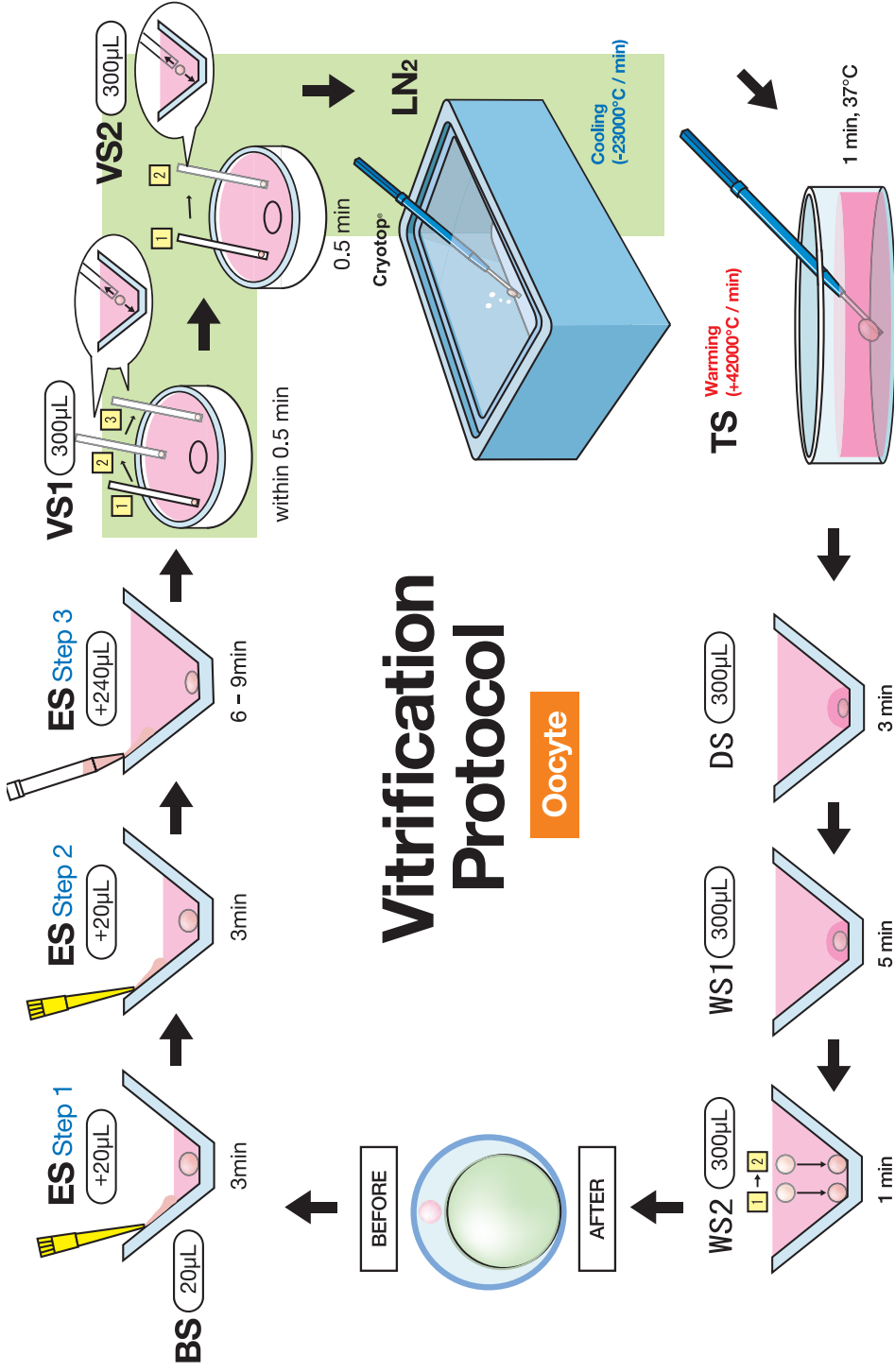
**TS** Warming  
(+42000°C / min)



1 min, 37°C

# Vitrification Protocol

Oocyte





The logo for KITAZATO, featuring the word "KITAZATO" in a bold, blue, sans-serif font. The letter "Z" is stylized with a red diagonal stroke through it. A registered trademark symbol (®) is located to the upper right of the "O".

**KITAZATO®**

[www.kitazato.co.jp](http://www.kitazato.co.jp)