

Primera experiencia argentina para validar el protocolo de vitrificación ultra-rápida en ovocitos humanos.

First Argentinean experience to validate the ultra-rapid vitrification protocol in human oocytes.

Meneghini MA¹; Marconetto A¹; Arenas G¹; Leocata F¹; Ahumada A¹

¹ PROCREARTE, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Pregunta de estudio: ¿Qué puede concluirse de una primera experiencia en el uso técnicas de vitrificación ultra-rápidas en ovocitos respecto del método convencional?

Respuesta resumida: Las técnicas de vitrificación ultra-rápidas insumen un menor tiempo con óptimas tasas de sobrevivencia ovocitaria.

Lo que ya se sabe: La vitrificación de ovocitos representa una estrategia efectiva para casos de preservación de la fertilidad y es uno de los procedimientos que mayor consumo de tiempo representan en la rutina del laboratorio.

Investigaciones recientes han propuesto la posibilidad de realizar una exitosa criopreservación de ovocitos empleando una técnica de vitrificación ultra-rápida.

Diseño del estudio: Prospectivo, transversal, experimental, descriptivo.

Materiales y Métodos: Se utilizaron 96 ovocitos Metafase II provenientes de nuestro programa de ovodonación. Se distribuyeron en 3 grupos de acuerdo con las técnicas de criopreservación a las que fueron sometidos.

ABSTRACT

Study question: *What can be concluded from the first experience of using ultrafast vitrification compared to the conventional method?*

Summary answer: *Ultra-rapid vitrification techniques reduce the procedure time with optimal oocyte survival rates.*

What is already known: *Oocyte vitrification is an effective strategy for fertility preservation; however this is one of the most time-consuming techniques in routine laboratory practice.*

Recent research has suggested the possibility of successful oocyte cryopreservation using an ultra-fast vitrification technique.

Study design: *Cross-sectional, experimental, descriptive.*

Materials and Methods: *96 Metaphase II oocytes from our oocyte donation programme were used. They were divided into 3 groups according to the cryopreservation techniques used. Group I: Conventional vitrification - conventional heating; Group II: Conventional vitrification - ultra-fast heating adapted for*

Grupo I: Vitrificación convencional – calentamiento convencional; *Grupo II:* Vitrificación convencional – calentamiento ultra-rápido adaptado para ovos vitrificados convencionalmente; *Grupo III:* vitrificación ultra-rápida - calentamiento ultra-rápido. Una hora posterior al calentamiento, se evaluó la sobrevida de los ovocitos. Por último, se consignaron los tiempos de ejecución de cada grupo. Los resultados se expresaron en porcentaje por grupo.

Resultados: Se asignaron 32 ovocitos a cada grupo experimental. Se obtuvo una sobrevida del 90,6% (29/32), 100% (32/32) y 100% (32/32) y se registró el tiempo de procesamiento para la congelación/descongelación de 32 ovocitos de 68 min, 54 min y 49 min para los grupos I, II y III, respectivamente.

Limitaciones del estudio: Se requiere aumentar el tamaño muestral y diversificar la población de estudio para generalizar su aplicación.

Implicancias de los hallazgos: Nuestros resultados obtenidos en esta primera experiencia argentina confirman que la vitrificación de ovocitos con técnicas ultra-rápidas (i) son igual o superiores en efectividad (sobrevida) al protocolo convencional, (ii) implican una notable reducción en los tiempos de trabajo (iii) pueden ser incorporadas a la rutina del laboratorio y aplicarse a ovocitos vitrificados convencionalmente.

Palabras clave: Vitrificación, técnicas reproductivas, ovocitos, fertilización in vitro, criobiología.

conventionally vitrified oocytes; Group III: Ultra-fast vitrification - ultra-fast heating. One hour after heating, oocyte survival was assessed, and the run times for each group were recorded. Results were expressed as a percentage per group.

Main results: *Thirty-two oocytes were assigned to each experimental group. Survival was 90.6 % (29/32), 100 % (32/32) and 100 % (32/32) and processing time for cryopreservation of 32 oocytes was 68 min, 54 min and 49 min for groups I, II and III, respectively.*

Limitations: *Increasing the sample size and diversifying the study population is required to generalize its application.*

Wider implications of the findings: *Our results obtained in this first Argentinean experience confirm that vitrification of oocytes with ultra-rapid techniques (i) are equal or superior to the conventional method in terms of survival rate, (ii) imply a notable reduction in working times, (iii) can be incorporated into the laboratory routine as they can be applied to conventionally vitrified oocytes.*

Key words: *Vitrification, reproductive techniques, oocytes, in vitro fertilisation, cryobiology.*

INTRODUCCIÓN

La vitrificación de ovocitos se incorporó a las técnicas de reproducción asistida en humanos a finales de la década de 1980⁽³⁾. Se aplica en casos de preservación de la fertilidad femenina, acopio de ovocitos en pacientes bajas respondedoras, vitrificación de ovocitos de donantes para su asignación diferida, entre otros. Su versatilidad y creciente demanda han vuelto a esta técnica parte de la rutina diaria del laboratorio de reproducción asistida. Así como también, uno de los procedimientos de mayor consumo de tiempo en el flujo de trabajo del laboratorio.

Independientemente de los kits comerciales de vitrificación elegidos, la mayoría de los protocolos de vitrificación para ovocitos son muy similares⁽¹⁾. Suelen incluir dos o más fases de exposición —gradual o directa— a soluciones crecientemente hipertónicas compuestas por crioprotectores (CPAs) permeables y no permeables. La composición de estas soluciones y la duración de la exposición de las células son fundamentales, ya que la toxicidad de los CPAs depende tanto del tiempo como de la concentración⁽²⁾.

Cuando se exponen a soluciones hipertónicas, las células inicialmente pierden agua y se encogen a un volumen mínimo muy rápidamente. Después de ese punto, lentamente vuelven a hincharse hacia su volumen isotónico, ya que las concentraciones de solutos intra y extracelulares tienden al equilibrio osmótico⁽⁶⁾. Esta fase se denomina de equilibrio y entre 8 a 15 minutos. A esto le sigue una exposición corta a una solución más concentrada, la cual se vitrifica al enfriarse a altas velocidades (solución de vitrificación, VS)⁽⁴⁾. La VS constituye el paso final de los protocolos de Vitrificación, allí las células se suspenden, se cargan en el dispositivo soporte

y se enfrían rápidamente. La exposición a VS es corta y no permite que las células se equilibren; se encogen, se deshidratan y se permean con crioprotectores. La duración de la exposición debe controlarse cuidadosamente y limitarse a 60 segundos para evitar el shock osmótico⁽¹⁰⁾.

La etapa de equilibrio es lo que contribuye a la mayor parte de la duración del procedimiento de vitrificación. Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que son factibles protocolos más cortos para la vitrificación exitosa de ovocitos. Es posible alcanzar el contenido crítico de soluto citosólico necesario para una vitrificación exitosa de forma más rápida (a las velocidades de enfriamiento y calentamiento alcanzables en la práctica del laboratorio de FIV)⁽⁹⁾.

Por lo expuesto, los objetivos del presente estudio fueron (i) comparar la tasa de sobrevivencia ovocitaria utilizando protocolos de vitrificación UR y convencionales y (ii) registrar el consumo de tiempo para llevar a cabo cada técnica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Transversal analítico, randomizado, descriptivo.

Periodo de estudio, tamaño muestral y población

El estudio se llevó a cabo entre el mes de Abril y Junio de 2024 y se utilizaron 96 ovocitos metafase II de donantes. Las donantes fueron evaluadas y seleccionadas en base a los protocolos estándar de la clínica.

Estimulación ovárica

Las donantes fueron sometidas a una estimulación ovárica controlada. Se les indicó la administración de Hormona foliculo estimulante (FSH) recombinante

y Gonadotropina menopáusica humana (HMG) altamente purificada desde el segundo día de su ciclo menstrual y durante 8-12 días hasta obtener folículos ≥ 17 mm. Se utilizó Gonadotropina coriónica humana (hCG) como droga de descarga y antagonistas de Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRh) para evitar el pico prematuro de Hormona Leutilizante (LH) durante la estimulación. Se realizaron monitoreos regulares del tamaño de los folículos vía ecografía transvaginal y dosajes de Estradiol. La aspiración folicular fue realizada 36 hs posterior a la descarga.

Búsqueda de ovocitos y desnudación

A medida que los complejos cúmulo-corona-ovocito (COCs) fueron identificados en el líquido folicular, se los transfirió a un medio de cultivo HTF suplementado con 5% de HSA y tamponado con HEPES previamente calentado (Irvine Scientific, Santa Ana, CA). Una vez finalizada la aspiración, se recortaron cuidadosamente los COCs procurando remover principalmente células oscuras y restos sanguíneos. Finalmente, los COCs fueron transferidos a una nueva placa conteniendo medio HTF suplementado con un 5% de HSA y pre equilibrado en una atmósfera de 5%CO₂ y 37°C, logrando un pH entre 7.25 y 7.35.

La remoción de las células del cúmulo y la corona fue realizada entre las 37-37.5 horas post hCG. Se expuso a los COCs a una solución de 4 UI/ml de hialuronidasa (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y se realizó la remoción mecánica de las células utilizando pipetas de vidrio de diferentes calibres en gotas de medio de cultivo HTF suplementado con un 5% de HSA y tamponado con HEPES (Irvine Scientific, Santa Ana, CA).

Aquellos ovocitos con evidente presencia del primer corpúsculo polar (presunta-

mente en estadio de MII de maduración) fueron seleccionados e incubados en medio de cultivo NX Complete con 5%HSA (Irvine Sci., California), a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 6% CO₂, 5% O₂ y un pH entre 7.25-7.35. Finalmente, fueron criopreservados cumplidas las 38 horas post hCG.

Técnicas de criopreservación

Vitrificación convencional (VITCONV): 12-15 min Solución de Equilibrio (ES) a 23-24°C, 1 min Solución de Vitrificación (VS) a 23-24°C.

Calentamiento convencional (CALCONV): 1 min Solución de Calentamiento (TS) a 37°C, 3 min Solución de Dilución (DS) a 23-24°C, 5 + 1 min Solución de Lavado (WS) a 23-24°C.

Vitrificación ultra-rápida (VITUR): 1 min ES a 23-24°C, 1 min VS a 23-24°C.

Calentamiento ultra-rápida (CALUR): 1 min DS a 37°C, 1 min WS a 37°C.

Calentamiento ultra-rápido adaptado a ovocitos vitrificados con métodos convencionales (CALURAD): 1 min TS a 37°C, 1 min DS a 37°C, 1 min WS a 37°C

Los ovocitos se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos de acuerdo a las técnicas de criopreservación y calentamiento a las que fueron sometidos. Grupo I: VITCONV – CALCONV (n=32), Grupo II: VITCONV - CALURAD (n=32), Grupo III: VITUR-CALUR (n=32).

Los medios, soportes y placas utilizados durante los protocolos de vitrificación y calentamiento fueron de la marca Kitazato (Dibimed, Valencia).

Posterior al calentamiento los ovocitos fueron incubados en medio de cultivo NX Complete con 5%HSA (Irvine Sci., California), a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 6% CO₂, 5% O₂ y un pH entre 7.25-7.35.

La sobrevida ovocitaria se evaluó bajo microscopio a un aumento 200x, 1 hora posterior a su calentamiento.

Finalmente, se consignaron los tiempos de ejecución de las técnicas de vitrificación y calentamiento correspondientes a cada grupo experimental. Cabe mencionar que, para la técnica convencional, los protocolos fueron solapados para la optimización de tiempo.

Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva a fin de presentar los resultados obtenidos e identificar tendencias dentro de los ensayos realizados. Los resultados se expresan como el total y porcentaje obtenidos de cada variable analizada.

Consideraciones éticas

Las donantes incluidas en el presente estudio realizaron la firma de un consentimiento informado en el que consta su voluntad de ceder el uso de sus ovocitos para el presente protocolo de investigación.

RESULTADOS

La tabla 1 resume los resultados obtenidos para cada grupo experimental.

DISCUSION

Los protocolos para preparar ovocitos para la vitrificación tienen como objetivo

evitar la formación de cristales de hielo intracelular y lograr obtener ovocitos con tasas de fertilización y desarrollo de embriones viables comparables con ovocitos frescos⁽¹⁾.

Nuestros resultados, expuestos en esta primera experiencia del uso de técnicas de criopreservación UR en Argentina, muestran tasas de sobrevida ovocitaria similares e incluso mejores respecto a la técnica convencional (100 % frente a 90 %). Estos resultados son compatibles con la evidencia acumulada por otros grupos de investigadores^(9,5). Además, la tasa de sobrevida ovocitaria del grupo II (VITCONV-CALURAD) demuestra la versatilidad de estas técnicas, ya que pueden aplicarse a ovocitos previamente vitrificados con el protocolo convencional. Este aspecto es importante porque permite: (i) implementarlo en laboratorios donde hasta la fecha se haya aplicado la técnica convencional de vitrificación y (ii) usarlo en ovocitos trasladados desde otra clínica o banco que utilice técnicas convencionales.

Las técnicas de vitrificación/calentamiento son una de las tareas principales en el laboratorio de FIV actual. Con el objetivo de optimizar el consumo de tiempo durante las diferentes rondas de vitrificación, los protocolos convencionales suelen solaparse entre sí. Este solapamiento consiste en utilizar los intervalos entre

Tabla 1. Resultados de sobrevida ovocitaria y tiempo de procesamiento de las técnicas de vitrificación/calentamiento convencional y ultra-rápida. La duración del procedimiento comprende los procesos de vitrificación y calentamiento del total de ovocitos de cada grupo.

Grupos experimentales	N (número de ovocitos)	Ovocitos vitales (%)	Duración del procedimiento(min)
Grupo I (VITCONV-CALCONV)	32	29 (90,6%)	68 min
Grupo II (VITCONV-CALURAD)	32	32 (100%)	54 min
Grupo III (VITUR-CALUR)	32	32 (100%)	40 min

los diferentes pasos de un protocolo para comenzar o continuar con los pasos de un segundo (o incluso un tercer) protocolo en paralelo. Si bien estos solapamientos se llevan a cabo con extremo cuidado, debido a su propia configuración, podrían ser una fuente de error en el laboratorio. En este sentido, las técnicas de vitrificación UR podrían resultar más seguras, ya que las rondas de vitrificación/calentamiento se realizan de una en una.

Debido a la creciente demanda de pacientes que requieren criopreservación de ovocitos en clínicas de FIV de todo el mundo para preservar su fertilidad, uno de los aspectos más atractivos que impulsan a incorporar las técnicas UR en la práctica diaria es que permiten un notable ahorro de tiempo en comparación con las técnicas convencionales. Basándonos en nuestros resultados, para vitrificar la misma cantidad de ovocitos (n=32), la técnica UR toma alrededor de 30 min menos que las técnicas convencionales.

No obstante, el presente trabajo no está exento de limitaciones. La diversificación

de la población de estudio permitiría obtener resultados extrapolables a otros grupos potenciales de pacientes. Del mismo modo, ampliar el tamaño de la muestra permitiría realizar un análisis estadístico.

En líneas generales, la novedosa técnica plantea una reducción del tiempo de cada paso respecto al protocolo convencional y modificaciones en la temperatura a la que se lleva a cabo cada etapa. Sin embargo, lo más interesante es que las modificaciones propuestas respecto al protocolo convencional suponen una revisión total de los fundamentos y criterios básicos considerados esenciales para el éxito de la vitrificación de ovocitos^(7,8).

En conclusión, el uso de técnicas de criopreservación UR en ovocitos arroja resultados muy prometedores, incluso mejores que los de las técnicas convencionales. No obstante, antes de su aplicación clínica, es necesario validar correctamente su uso y llevar a cabo estudios de investigación básica que permitan evaluar la competencia de los ovocitos vitrificados por técnicas ultra-rápidas.

REFERENCIAS

1. Alpha Scientists In Reproductive Medicine (2012). The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. *Reproductive biomedicine online*, 25(2), 146–167. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.05.006>
2. Benson, J. D., Kearsley, A. J., & Higgins, A. Z. (2012). Mathematical optimization of procedures for cryoprotectant equilibration using a toxicity cost function. *Cryobiology*, 64(3), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.01.001>
3. Casciani, V., Monseur, B., Cimadomo, D., Alvero, R., & Rienzi, L. (2023). Oocyte and embryo cryopreservation in assisted reproductive technology: past achievements and current challenges. *Fertility and sterility*, 120(3 Pt 1), 506–520. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.06.005>
4. Fahy, G. M., Levy, D. I., & Ali, S. E. (1987). Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*, 24(3), 196–213. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90023-x](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90023-x)
5. Gallardo, M., Saenz, J., & Risco, R. (2019).

- Human oocytes and zygotes are ready for ultra-fast vitrification after 2 minutes of exposure to standard CPA solutions. *Scientific reports*, 9(1), 15986. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52014-x>
6. Kleinhans F. W. (1998). Membrane permeability modeling: Kedem-Katchalsky vs a two-parameter formalism. *Cryobiology*, 37(4), 271–289. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2135>
 7. Kuwayama M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67(1), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.014>
 8. Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., & Leibbo, S. P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 11(3), 300–308. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60837-1](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60837-1)
 9. Liebermann, J., Brohammer, R., Wagner, Y., Smith, R., Even, K., Hirshfeld-Cytron, J., & Uhler, M. L. (2024). Fast and furious: successful survival and resumption of meiosis in immature human oocytes vitrified and warmed using a short protocol. *Reproductive biomedicine online*, 49(1), 103976. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2024.103976>
 10. Rall W. F. (1987). Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24(5), 387–402. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90042-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90042-3)