



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TÍTULO**

**Formación y calidad de blastocistos en un programa de donación de  
óvulos en el centro de fertilidad IECH: Análisis comparativo de  
vitrificados vs frescos**

**TESIS**

para obtener el título de  
**Sub-especialista en  
Biología de la Reproducción Humana**

**PRESENTA**

Dra. Lilyana Carolina de la O Tamez

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. José Iram Obeso Montoya

Monterrey, Nuevo León

Febrero de 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

A mi familia, a mis padres, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su comprensión y estímulo constante, además de su apoyo en todas las etapas de mis estudios, a mis hermanas por siempre entender cuando no estuve presente y gracias por sus ánimos de sus expectativas en mi futuro.

A mi esposo, por haberme apoyado a cumplir mis metas, por la paciencia y espera que me regalaste, por estar siempre ahí para escucharme en mis momentos de logro y en mis momentos de estrés, gracias amor.

A mi director de tesis, Dr. Iram Obeso por su esfuerzo y dedicación, quien gracias a sus conocimientos y experiencia logramos culminar este trabajo con éxito.

A los biólogos Genaro y Samuel, gracias por tomarse el tiempo para explicarme y comentar dudas y resultados de este trabajo, gracias por su paciencia para responder preguntas de pasillo y gracias por su amistad.

Al Dr. Pedro Galache, por sus enseñanzas no solo en la parte clínica de esta especialidad, sino también por siempre insistir en que uno de los secretos del éxito es siempre escuchar y estar pendientes de nuestras pacientes, además gracias por los consejos de vida que siempre les da a todos los estudiantes.

A todos mis compañeros residentes que escucharon mis dudas y observaron las dificultades de este trabajo y que siempre tuvieron un comentario para ayudarme o para hacerme reír.

Y por último agradezco a todas las personas que de una u otra forma me apoyaron en la realización de este trabajo.

## **Datos de identificación**

Formación y calidad de blastocistos en un programa de donación de óvulos en el centro de fertilidad IECH: Análisis comparativo de vitrificados vs frescos

Título

Dra. Lilyana Carolina de la O Tamez

Autor

Dr. José Iram Obeso Montoya

Asesor clínico y profesor de la subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana

Director Médico / Coordinador del Programa de Donación de Óvulos

Dr. Salomón Alvarado Ramos

Asesor metodológico

Doctor en investigación clínica

Dr. Pedro Galache Vega

Titular de la subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana

Dr. Julio César Rosales de León

Coordinador de Enseñanza de la subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana

Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Institución académica

Instituto para el Estudio de la Concepción Humana, Monterrey, Nuevo León, México

Institución sede

## **Glosario**

AB. Anticuerpo

AGnRH. Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina

ASRM. American Society for Reproductive Medicine (Sociedad Americana de Medicina Reproductiva)

B-hCG. Subunidad beta de la hormona gonadotropina coriónica humana

eSET. Transferencia de embriones único

ETS. Enfermedades de transmisión sexual

FCF. Frecuencia cardiaca fetal

FDA. Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)

FIV. Fertilización in Vitro

GV. Vesícula gestacional

hMG. Gonadotropina menopáusica humana

HMR. Huevo muerto retenido

HSG. Histerosalpingografía

ICSI. inyección intracitoplasmática de espermatozoides

IVI. Instituto Valenciano de Infertilidad

LBR. Tasa de nacido vivo

MCI. Masa celular interna

MI. Metafase I

MII. Metafase II

NAT. Prueba de ácido nucleico

rFSH. Hormona folículo estimulante recombinante

SART. Society for Assisted Reproductive Technology

T2. División a 2 células

tB. Blastulación

TE. Trofodermo

TE. Transferencia embrionaria

VIH. Virus de Inmunodeficiencia Humana

## Índice de tablas

Tabla 1. Sistema de Gardner y Schoolcraft .....	18
Tabla 2. Sistema de puntuación del consenso para blastocistos .....	19
Tabla 3. Clasificación de blastocisto en IECH .....	24
Tabla 4. Clasificación calidad embrionaria .....	25
Tabla 5. Características demográficas y datos embriológicos.....	28
Tabla 6. Grado y calidad de blastocistos .....	29
Tabla 7. Resultados clínicos .....	30
Tabla 8. Formación y calidad de blastocistos, análisis exclusivo con ciclos de ICSI .....	31
Tabla 9. Resultados clínicos, análisis exclusivo con ciclos de ICSI .....	32

# Índice

1. Capítulo 1. Planteamiento del problema .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	2
1.3 Objetivos.....	2
1.3.1 Objetivo principal.....	2
1.3.2 Objetivos secundarios.....	2
1.4 Hipótesis.....	3
1.5 Justificación.....	3
1.6 Alcance del estudio.....	4
2. Capítulo 2. Marco teórico .....	5
3. Capítulo 3. Metodología .....	21
3.1 Diseño del estudio.....	21
3.2 Donantes de ovocitos y estimulación ovárica.....	22
3.3 Procedimiento de laboratorio .....	23
3.4 Evaluación del embarazo .....	25
3.5 Variables y Análisis estadístico.....	25
4. Capítulo 4. Resultados .....	27
5. Capítulo 5. Análisis y discusión de resultados .....	33
6. Capítulo 6. Conclusión .....	37
7. Bibliografía .....	38

# **Capítulo 1. Planteamiento del problema**

## **1.1 Antecedentes**

Después del primer informe exitoso de un embarazo con fertilización in vitro (FIV) logrado a través de ovocitos de donantes en 1984, las técnicas de reproducción asistida (ART) se ampliaron aún más para incluir a las mujeres que no pueden concebir con sus propios ovocitos. Hoy, la donación de ovocitos constituye un porcentaje cada vez mayor de todos los ciclos de ART en todo el mundo<sup>1</sup>. En Estados Unidos representan casi el 10% al 14% de todos los ciclos, con tasas de nacido vivo superiores al 50% por ciclo.<sup>1,2</sup>

La donación de ovocitos presenta varios desafíos únicos para los médicos, ya que dos intereses separados, los de la donante y los de la receptora, deben estar representados. Estos desafíos incluyen la preparación exitosa del endometrio en las receptoras de ovocitos, la sincronización de los ciclos donante / receptora y la optimización de la estimulación ovárica al tiempo que se maximiza la seguridad de las donantes. Enfrentar estos desafíos no solo ha permitido la creación de programas exitosos de donación de óvulos, sino que también ha brindado información sobre muchos aspectos de ART.<sup>1</sup>

## **1.2 Planteamiento del problema**

Las técnicas de reproducción asistida nos han ayudado a dar solución a los diversos problemas biológicos que puede tener una pareja para concebir un hijo, ya sea por un proceso de inseminación artificial o fertilización in vitro, en ambos casos las técnicas pueden ser homóloga si los gametos proceden de la misma pareja, o heteróloga si proceden de algún tercero. Dentro de los procedimientos de naturaleza heteróloga encontramos la donación de óvulos, la cual se ha convertido en el tratamiento de elección para las mujeres con una calidad deficiente de los ovocitos o ausencia de los mismos, y



nos ha permitido cumplir con el objetivo de lograr un embarazo y principalmente un nacido vivo sano.

Por lo tanto, siendo esta otra opción terapéutica, los centros de fertilidad ofrecen programas de donación utilizando óvulos frescos (tradicional) u óvulos vitrificados (banco de óvulos). La donación de ovocitos frescos es una tecnología probada, mientras existe aún cierta controversia con el uso de óvulos vitrificados, a pesar, de las mejoras en las técnicas de criopreservación de ovocitos, ya que ha evolucionado de un proceso de congelación lenta a un proceso de vitrificación, el cual tiene como ventajas ser un procedimiento con enfriamiento ultrarrápido para solidificar la célula sin la formación de cristales de hielo y disminuir las lesiones por frío y un calentamiento a temperaturas relativamente altas.

Los estudios han demostrado que las tasas de fertilización, formación y calidad de blastocisto, así como las tasas de embarazo pueden ser similares a la FIV/ICSI (Inyección intracitoplasmática de espermatozoides) con ovocitos frescos cuando los ovocitos vitrificados/desvitrificados se usan como parte del ICSI para mujeres jóvenes.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

- Comparar el porcentaje de recuperación y la calidad de los blastocistos desarrollados con óvulos vitrificados y óvulos frescos en ciclos de donación en el Instituto para el Estudio de la Concepción Humana entre Enero 2014 hasta Diciembre 2018.

#### **1.3.2 Objetivos secundarios**

- Conocer la tasa de supervivencia de los óvulos vitrificados del banco de donación.

- Comparar el porcentaje de fertilización de los ovocitos vitrificados y ovocitos frescos en ciclos de donación.
- Analizar el desarrollo embrionario de los ovocitos vitrificados en comparación con los ovocitos frescos en ciclos de donación.
- Comparar los resultados clínicos obtenidos en ciclos con ovocitos vitrificados y ovocitos frescos en donación.

#### **1.4 Hipótesis**

**Hipótesis Nula:** En ciclos de donación con ovocitos vitrificados el porcentaje de recuperación y la calidad de los blastocistos es similar al resultado obtenido con ovocitos frescos.

**Hipótesis alterna:** En ciclos de donación con ovocitos vitrificados el porcentaje de recuperación y la calidad de los blastocistos es menor al resultado obtenido con ovocitos frescos.

#### **1.5 Justificación**

La criopreservación de ovocitos se ha utilizado no solo como almacenamiento para los ovocitos supernumerarios, también para dar una oportunidad de preservar la fertilidad en mujeres con riesgo de perder la función ovárica y para los programas de donación de óvulos (banco de óvulos), nuestro tema a tratar.

La donación de ovocitos constituye un porcentaje cada vez mayor en los ciclos de Técnicas de Reproducción Asistida en el mundo y es un tratamiento eficiente cuando existe una calidad deficiente de los ovocitos o una ausencia de los mismos. Se puede sugerir el uso de óvulos frescos o utilizar óvulos vitrificados (banco de óvulos) el cual, proporciona más opciones para seleccionar un ciclo y una donante.

Por lo tanto, es importante identificar si el procedimiento de criopreservación (vitrificación), preserva el potencial de fertilización y la capacidad de convertirse en

blastocistos de alta calidad, similares a los embriones formados de ovocitos frescos. El resultado clínico exitoso indicará la efectividad del uso de este procedimiento para el programa de donación de ovocitos (banco de óvulos) y para el almacenamiento de ovocitos en general.

La importancia en esto radicará en que podremos indicar la donación de ovocitos vitrificados como primera opción, ya que tendríamos los mismos resultados clínicos, sin la necesidad de un periodo de espera para la asignación de la donadora y no sería necesaria la sincronización entre la donante y la receptora, lo que permite a la pareja y al médico elegir el mejor momento para realizar el procedimiento ya sea por razones personales, sociales o médicas, también podría ser más seguro ya que nos permite la cuarentena de los óvulos por 6 meses o más.

## **1.6 Alcance del estudio**

Dentro del estudio solo se incluyeron a pacientes que ingresaron al programa de donación de óvulos en el Instituto para el Estudio de la Concepción Humana Monterrey, valorándose la evolución de los óvulos frescos y vitrificados hasta la primera transferencia embrionaria, no incluyendo transferencias embrionarias posteriores para conocer la tasa de embarazo acumulada.

## Capítulo 2. Marco teórico

La donación de óvulos es uno de los tratamientos que ofrecen los especialistas en infertilidad, aunque inicialmente se destinó a mujeres con insuficiencia ovárica prematura, su uso se ha extendido a mujeres con una variedad de defectos en la producción, función o cantidad del óvulo.

### 2.1 Historia

Los primeros informes de donación de óvulos humanos aparecieron en 1983 por Trounson donde informaron un embarazo después de la donación de un ovocito por una mujer infértil sometida a Fertilización in Vitro (FIV). La donante había recibido estimulación ovárica controlada y la receptora había ovulado al mismo tiempo que se realizó la extracción de óvulos. Uno de los ovocitos recuperados fue donado a la receptora y se inseminó con el espermatozoides del esposo de la receptora. El embrión resultante se transfirió, se logró el embarazo, pero luego abortó.

En un intento posterior, una paciente de FIV volvió a donar un solo ovocito, esta vez a una mujer con insuficiencia ovárica prematura (Lutjen et al., 1984), el útero se preparó con una combinación de estradiol oral y progesterona vaginal. La receptora quedó embarazada y llevó el embarazo a término, convirtiéndose así en la primera donación de óvulos exitosa<sup>1,3</sup>.

La donación de óvulos se convirtió rápidamente en el tratamiento de elección obvio para las mujeres con insuficiencia ovárica prematura. El evento histórico del embarazo en una mujer sin función ovárica corrobora la hipótesis de que el estrógeno y la progesterona exógenos podrían producir de manera confiable un endometrio receptivo. En mujeres con función ovárica residual, los ciclos de donantes y receptores podrían sincronizarse con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (aGnRH) y el endometrio receptor estimulado con esteroides exógenos. Estos principios esenciales siguen siendo los componentes clave de la práctica actual de la donación de óvulos<sup>3</sup>.

El procedimiento de donación de óvulos parecía ser una opción viable para las mujeres que necesitaban un óvulo donado para concebir, sin embargo, una barrera importante para el uso generalizado de la donación era la necesidad de anestesia general y laparoscopia para obtener los óvulos de las donantes, posteriormente la aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal vino a revolucionar la donación de ovocitos, ya que la recuperación de óvulos en la mayoría de los casos podía realizarse en un consultorio bajo sedación<sup>4</sup>.

Además, los primeros intentos de donación de óvulos utilizaron "ovocitos de repuesto" donados por mujeres infértiles, los cuales fueron suplidos con ovocitos obtenidos de donantes jóvenes y fértiles, los cuales produjeron resultados de FIV mucho mejores que los obtenidos con ovocitos de pacientes infértiles mayores<sup>4</sup>.

Por otro lado, el primer nacimiento humano de un ovocito criopreservado fue en Australia en 1986 por Chen mediante congelación lenta<sup>5</sup>, y el primer nacido vivo después del proceso de vitrificación se logró en 1999 por Kuleshova en una mujer de 47 años<sup>6</sup>.

## **2.2 Indicaciones**

La donación de ovocitos es un tratamiento exitoso y bien establecido para algunos problemas de infertilidad femenina, donde los ovocitos donados por mujeres jóvenes optimizan las cualidades de los ovocitos y los embriones posteriores, lo que resulta en altas tasas de embarazo y buenos resultados obstétricos observados en las receptoras<sup>7</sup>.

Dentro de las indicaciones para la donación de óvulos encontramos:

1. Mujeres con insuficiencia ovárica prematura<sup>3,8,9</sup>.
2. Casos de mala calidad del ovocito, como en pacientes con múltiples ciclos fallidos de FIV convencional<sup>3,8,9</sup>.
3. Mujeres de edad reproductiva avanzada con reserva ovárica disminuida<sup>3,8</sup>.
4. Sobrevivientes de cáncer con insuficiencia ovárica primaria secundaria a la quimioterapia<sup>3,8</sup>.

5. Mujeres con disgenesia gonadal (Personas con síndrome de Turner pueden concebir, pero tienen un mayor riesgo de complicaciones obstétricas)<sup>3</sup>.
6. Para evitar transmitir enfermedades genéticas hereditarias a sus hijos (Aunque el diagnóstico genético preimplantacional se aplica cada vez más en estas situaciones)<sup>3,8,9</sup>.
7. En situaciones sociales, como las parejas masculinas del mismo sexo, también está indicado el uso de ovocitos donantes y sustitutos gestacionales<sup>3</sup>.

### **2.3 Recomendaciones para donación y recepción de óvulos**

La Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM), publica recomendaciones para la donación de gametos y embriones, siendo las pautas para la donación y recepción de ovocitos las siguientes<sup>8</sup>:

#### **2.3.1 Evaluación de receptores.**

- a) En relación con la pareja receptora, se requiere de una consulta psicológica ya que la decisión de proceder con los ovocitos donados es compleja y las parejas pueden beneficiarse del asesoramiento psicológico. La evaluación debe incluir una entrevista clínica y cuando corresponda pruebas psicológicas.
- b) Evaluación de la receptora de ovocitos.
  - 1) Historia médica y reproductiva, las anomalías reproductivas detectadas a partir de la historia clínica o el examen físico pueden requerir una evaluación y tratamiento más detallados antes de utilizar los ovocitos de las donantes.
  - 2) Examen físico general completo, incluido un examen pélvico.
  - 3) Valoración de la cavidad uterina. Se debe realizar Histerosalpingografía (HSG), histerosonografía u otro procedimiento adecuado para detectar cualquier anomalía uterina significativa.
  - 4) Pruebas preconcepcionales, se recomiendan:
    - 1) Tipo de sangre, factor Rh y detección de anticuerpos.
    - 2) Títulos de rubéola y varicela.
    - 3) Pruebas de VIH-1, VIH-2 AB y detección de anticuerpos del grupo O del VIH.

- 4) Prueba serológica para sífilis.
  - 5) Antígeno de superficie para la hepatitis B, anticuerpo central de hepatitis B (IgG e IgM), Anticuerpos contra la hepatitis C y NAT.
  - 6) Neisseria gonorrhoeae y Chlamydia Trachomatis NAT en orina o un hisopo obtenido del cuello uterino, el meato uretral o la vagina.
- c) Evaluación de la pareja del receptor del ovocito, se recomiendan las siguientes pruebas de laboratorio:
- 1) Análisis de semen.
  - 2) Tipo de sangre y factor Rh.
  - 3) Prueba serológica para sífilis.
  - 4) Antígeno de superficie para la hepatitis B, anticuerpo central de hepatitis B (IgG e IgM), Anticuerpos contra la hepatitis C y NAT.
  - 5) Pruebas de detección de VIH-1 (AB y NAT), VIH-2 AB o pruebas de anticuerpos del grupo O del VIH.
  - 6) Detección genética y pruebas apropiadas basadas en la historia.

### **2.3.2 Donantes.**

- a) Selección:
- 1) La donación de ovocitos puede realizarse con donantes conocidos o anónimos, según las circunstancias clínicas.
  - 2) Se recomienda la evaluación psicológica.
  - 3) Las donantes de ovocitos deben ser mayores de edad y preferiblemente entre las edades de 21 y 34 años.
  - 4) La fertilidad comprobada en la donante es deseable pero no es necesaria.
  - 5) La donante debe someterse a una evaluación genética adecuada basada en la historia, de acuerdo con el origen étnico y las pautas actuales. La prueba de fibrosis quística debe realizarse en todos los donantes. Se deben considerar las pruebas de X frágil en donantes, pero no es obligatorio.

- 6) Intercambio de ovocitos de un ciclo de reproducción asistida: si se contempla el intercambio se debe obtener el consentimiento informado antes del inicio del ciclo.
- 7) Ningún propietario, operador o empleado de una instalación de detección o donación de ovocitos puede ser donante.
- 8) Si se utiliza una agencia para reclutar donantes de ovocitos, ninguna persona que tenga un interés financiero en esa agencia puede ser donante de ovocitos.

b) Detección y prueba de donantes de ovocitos.

- 1) Deben estar sanos y no presentar antecedentes que sugieran enfermedad hereditaria.
- 2) Obtener una historia personal y sexual completa para excluir como donantes a las personas que puedan estar en alto riesgo de contraer el VIH u otras ETS. No deben ser aceptados mujeres que en los últimos 5 años: Se inyectaron drogas por razones no médicas, han recibido concentrados de factor de coagulación derivados de humano, por hemofilia u otros trastornos de coagulación relacionados, han tenido relaciones sexuales con un hombre que ha tenido relaciones sexuales con otro hombre o han tenido relaciones sexuales a cambio de dinero o drogas.
- 3) Mujeres que han tenido relaciones sexuales en los 12 meses anteriores con cualquier persona que cumpla con cualquiera de los criterios descritos anteriormente, o con cualquier persona que tenga infección por VIH, incluida una prueba positiva o reactiva al virus del VIH, infección por hepatitis B o hepatitis C clínicamente activa.
- 4) Mujeres que han tenido contacto cercano (p. Ej., Que viven en el mismo hogar en el que se comparten regularmente las instalaciones de la cocina y el baño) dentro de los 12 meses anteriores a la donación con otra persona que tiene hepatitis B o infección por hepatitis C clínicamente activa (sintomática).
- 5) Haber estado encarceladas en prisión, durante más de 72 horas en el último año.
- 6) Antecedente de haber sido tratadas por sífilis, gonorrea o clamidia en el último año.



- 7) Haberse sometido a procedimientos de perforación corporal y/o tatuajes en el último año en los que no se usaron procedimientos estériles o no está claro si se usaron procedimientos estériles.
- 8) Haber recibido una vacuna reciente contra la viruela.
- 9) Antes de la aceptación y cada 6 meses sin dejar de ser un donante activo, los donante deben someterse a un examen físico completo y se deben rechazar cuando se presente alguno de los siguientes hallazgos: Evidencia física del riesgo de enfermedades de transmisión sexual, evidencia física de coito anal incluyendo condilomas perianales, evidencia física de uso no médico de drogas percutáneas, como huellas de agujas, tatuajes recientes o perforaciones (dentro de los 12 meses), linfadenopatía diseminada, aftas orales inexplicables, manchas azules o púrpuras compatibles con el sarcoma de Kaposi, ictericia inexplicada o hepatomegalia.

c) Se recomiendan las siguientes pruebas de laboratorio:

- 1) Pruebas de detección de VIH-1 (AB y NAT), VIH-2 AB o pruebas de anticuerpos del grupo O del VIH.
- 2) Antígeno de superficie para la hepatitis B, anticuerpo central de hepatitis B (IgG e IgM), Anticuerpos contra la hepatitis C y NAT
- 3) Prueba serológica para sífilis
- 4) *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia Trachomatis* NAT en orina o un hisopo obtenido del cuello uterino, el meato uretral o la vagina.
- 5) Aunque no es requerido por la FDA, las pruebas recomendadas también incluyen el tipo de sangre y el factor Rh.

## **2.4 Tipo de donación de óvulos**

El uso de ovocitos donados para el tratamiento de fertilización in vitro aumenta las posibilidades de embarazo y nacido vivo para pacientes con infertilidad que tienen una mala calidad o cantidad de ovocitos. De hecho, la FIV con donación de ovocitos generalmente tiene las tasas más altas de nacidos vivos (LBR) de cualquier tratamiento de FIV, con LBR del más del 50% en los Estados Unidos<sup>1,10</sup>. Debido a las tasas relativamente altas de nacidos vivos y a la creciente disponibilidad de "bancos" de ovocitos criopreservados el tratamiento se ha vuelto más fácil y menos costoso que en el pasado, por lo tanto, el número de ciclos de tratamiento con ovocitos de donantes ha aumentado<sup>10</sup>.

El procedimiento realizado con mayor frecuencia es la donación tradicional de óvulos (frescos) la cual es muy eficiente, pero podría presentar algunos inconvenientes como el tiempo de espera para la asignación de la donadora, que requiere una sincronización entre la donante y la receptora, de modo que los ovocitos se deben recolectar y transferir dentro de un cierto período de tiempo y que típicamente todos los óvulos de una donante se entregan a una sola receptora<sup>9,11,12</sup>, la segunda opción es el banco de óvulos (vitrificado), este ha presentado mejoras en la técnica de criopreservación, con tasas de supervivencia ovocitaria hasta más del 90% y con un proceso de fertilización, desarrollo embrionario e implantación comparables con la donación en fresco; además de los resultados, la facilidad de su uso, tanto para los donantes como para las receptoras y un menor costo, la convierten en una excelente opción, cabe mencionar que también podría ser más seguro, ya que los óvulos se pueden poner en cuarentena durante 6 meses (o más) para volver a analizar las enfermedades infecciosas<sup>6,9</sup>. Algo importante de mencionar es que el proceso de vitrificación de óvulos no es exclusivo para donación, esta técnica también nos permite preservar la fertilidad en mujeres que lo desean ya sea por causas sociales o médicas<sup>6,9</sup>.

Es importante recordar que la mayoría de las mujeres que usan ovocitos de donante tienen más de 40 años, y con el aumento de la edad, aumenta el riesgo de resultados adversos maternos y neonatales, por lo tanto la Sociedad Estadounidense de

Medicina Reproductiva recomienda transferir un solo embrión cuando la edad del donante de ovocitos es menor de 35 años, a pesar de esto, la transferencia electiva de un solo embrión (eSET; lo que significa que había al menos dos embriones disponibles, pero, opcionalmente, solo uno fue transferido, con los otros criopreservados) se usó en menos del 35% de todas las transferencias usando ovocitos de donantes en 2014 en Estados Unidos<sup>10</sup>.

## **2.5 Vitricación de óvulos**

La criopreservación tiene un papel fundamental en el tratamiento de la infertilidad, haciéndola más flexible y eficiente<sup>13</sup>. La criopreservación se refiere al enfriamiento de células y tejidos a temperaturas bajo cero para detener toda actividad biológica y preservarlos para su uso futuro. Los esfuerzos iniciales en la criopreservación fueron ineficaces porque las técnicas de enfriamiento condujeron a daño celular por el cambio de la concentración de solutos dentro de las células, la formación de hielo intra o extracelular y la deshidratación excesiva<sup>14</sup>.

El desafío principal con la criopreservación de ovocitos ha sido mantener la supervivencia del ovocito en metafase II, después del calentamiento, que está indirectamente relacionado con la estabilidad de la membrana plasmática de los ovocitos y la permeabilidad al agua y los crioprotectores. Además, se observa que el huso meiótico que se requiere para la segregación cromosómica es extremadamente sensible a los cambios de temperatura y al proceso de deshidratación-rehidratación; Sin embargo, se ha demostrado que el huso se desintegra durante el proceso de congelación y descongelación y que se vuelve a ensamblar en la mayoría de los ovocitos<sup>15</sup>. Los estudios han demostrado que las tasas de fertilización, formación de blastocisto y embarazo son similares a la FIV/ICSI con ovocitos frescos cuando los ovocitos vitricados/desvitricados se usan como parte del ICSI para mujeres jóvenes,<sup>14,16,17</sup> además, no aumenta la frecuencia de anomalías del desarrollo y complicaciones del embarazo<sup>15,18</sup>.

La técnica inicial para criopreservación de óvulos fue la congelación lenta combinada con descongelación rápida, la cual se asoció con la formación intracelular de cristales de hielo y bajas tasas de fertilización debido al endurecimiento de la zona pelúcida<sup>19</sup>, posteriormente se desarrolló una alternativa a la congelación lenta, la vitrificación, la cual utiliza altas concentraciones iniciales de crioprotectores y enfriamiento ultrarrápido utilizando volúmenes pequeños de solución (<1 µl) que están expuestos a nitrógeno líquido, para solidificar la célula sin la formación de cristales de hielo, esto junto con el calentamiento a temperaturas relativamente altas disminuye las lesiones por frío<sup>20</sup>. Además, realizar inyección intracitoplasmática de espermatozoides, se supera el endurecimiento de la zona pelúcida, producida por la criopreservación, conduciendo a mejores tasas de éxito.<sup>14,19,21,22</sup>

La evidencia de varios ensayos controlados aleatorizados sugirió que las tasas de fecundación y embarazo para las mujeres jóvenes fueron similares al uso de ovocitos vitrificados/desvitrificados en comparación con los ovocitos frescos, lo que llevó a la ASRM (American Society for Reproductive Medicine) a concluir en el 2012 que la vitrificación / desvitrificación de los ovocitos "ya no deberían considerarse experimentales". Esto abrió la puerta a la aplicación de la criopreservación de ovocitos para numerosas indicaciones, incluido el almacenamiento no autólogo de ovocitos<sup>6,14</sup>; Dentro de las aplicaciones clínicas para la criopreservación de ovocitos incluyen la preservación de la fertilidad por enfermedad, como en pacientes con cáncer, preservación de la fertilidad por razones sociales y por último nuestro tema a tratar los programas de donación de óvulos<sup>13,19</sup>, otras de las ventajas de criopreservar es que podemos minimizar el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica, podemos acumular ovocitos en pacientes con baja respuesta o almacenar ovocitos después de la estimulación ovárica controlada cuando la criopreservación de embriones no es deseada.<sup>13,20,22</sup>

Varios estudios han analizado las tasas de supervivencia de ovocitos vitrificados maduros en los ciclos de donación de óvulos, oscilando entre el 86% y 97 %, con tasas de fertilización después del ICSI entre el 71% a 76%, en comparación con las tasas de

fertilización de los ovocitos frescos de donante que varían del 71% al 82%, en relación al número de blastocistos este parecería ser contradictorio o encontrar mayor número de blastocistos con el uso de óvulos frescos, mientras que la tasa de implantación, la tasa de embarazo clínico y de embarazo en curso no parecen diferir<sup>21</sup>.

Existen diferentes informes que muestran buenos resultados clínicos después de la criopreservación de los ovocitos, por ejemplo, Cobo en el 2010 publicó un ensayo clínico aleatorizado, prospectivo, triple ciego, en un centro único (IVI), comparando las tasas de embarazo en curso de los ovocitos frescos y ovocitos vitrificados en 584 receptoras (vitrificado=295 y fresco= 289), con respecto a la fertilización, la escisión de día 2,3 y la proporción de embriones de alta calidad obtenidos por ovocitos inseminados (ambos por ICSI) fue similar en ambos grupos. 526 pacientes fueron sometidos a transferencia embrionaria en día 3, 267 (90.5%) con óvulos vitrificados y 259 (89.6%) con óvulos frescos. La implantación, la tasa de embarazo por ciclo y por transferencia de embriones fueron similares ( $p= 0.745$ ,  $p= 0.933$ ,  $p= 0.974$ , respectivamente), así mismo la tasa de embarazo en curso por intención a tratar fue de 43.7% para el vitrificado y de 41.7% para el fresco, no se demostró la superioridad del grupo fresco (IC 95%= 0.688-1.323;  $p= 0.779$ ). Por lo tanto, ellos confirmaron la efectividad de almacenamiento criogénico de los ovocitos en un programa de donación, al no demostrar la superioridad del uso de ovocitos frescos con respecto al uso de ovocitos vitrificados<sup>23</sup>.

M. Solé et al., (2013) también investigó cómo afecta la vitrificación, la viabilidad de los ovocitos en los ciclos de donación, utilizando ovocitos de una donadora, los cuales fueron divididos para una transferencia en fresco y otros fueron vitrificados para posteriormente ser asignados a una receptora diferente. Se incluyeron 99 ciclos (2087 ovocitos), la media de los ovocitos para el grupo de frescos fue estadísticamente mayor ( $11.1 \pm 2.53$ ) que en los ovocitos vitrificados ( $10.0 \pm 1.68$ ,  $p < 0.05$ ); las tasas de supervivencia para los óvulos vitrificados fueron del 85.6% y el número de ovocitos después del calentamiento fue significativamente menor ( $8.6 \pm 2.12$ ,  $p < 0.01$ ). Tanto la FIV (32.3%) como la ICSI (67.7%) se usaron para inseminar ovocitos frescos, la técnica de inseminación no afectó los resultados y se obtuvo una proporción similar de

embriones en curso. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en, fertilización (80.7 vs 78.2%), embriones en curso y tasas de embrión de buena calidad (Día 2) (54.1 vs 49.8%), tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en implantación (33.3 vs 34%,  $p \geq 0.05$ ), embarazo clínico, embarazo en curso, o la tasa de nacidos vivos por ciclo (38.4 vs 43.4%,  $p \geq 0.05$ ). Por lo tanto, la vitrificación no afectó la funcionalidad de los ovocitos ni a su capacidad para producir embriones, embarazos y nacidos vivos<sup>24</sup>.

García et al., 2010, evaluó el desarrollo embrionario de los ovocitos vitrificados vs los ovocitos frescos en ciclos de donación de óvulos, pero a diferencia de los estudios previos ellos siguieron el desarrollo hasta etapa de blastocisto. Se incluyó 283 ovocitos MII en el grupo vitrificados, con una tasa de supervivencia del 89.4% (253 ovocitos) y 695 ovocitos en el grupo fresco, estos último fueron fertilizados según la muestra espermática. Durante el estudio no se observaron diferencias en la tasa de fertilización (76.1 y 87.5%), la tasa de escisión del día 2 o la tasa de formación de blastocistos (41.3 y 45.3%) entre los grupos, además los embriones en esta última etapa eran morfológicamente similares. Las tasas de embarazo clínico fueron similares para ambos grupos. Por lo tanto, ellos confirman que la competencia de los óvulos no se afecta con el proceso de vitrificación<sup>25</sup>.

Del mismo modo Domingues et al., 2017, evaluó los resultados clínicos de los ciclos con ovocitos frescos (78) y vitrificados (426) en un programa de donación de óvulos después de la transferencia de blastocisto. Encontraron que la tasa de fertilización y la tasa de formación de blastocistos (48.8% vs 51%) fueron similares entre los grupos, al igual que las tasas de implantación y las tasas de embarazo clínico, las cuales fueron 60.9% (óvulos frescos) y 59.0% (óvulos vitrificados). Por lo tanto, ellos sugieren que los ovocitos vitrificados podrían utilizarse de manera segura en un programa de donación de óvulos<sup>11</sup>.

Existen además otras publicaciones (Cobo et al., 2008<sup>26</sup>; Zsolt P et al., 2009<sup>13</sup>; Krinos M. et al., 2011<sup>27</sup>; que apoyan el procedimiento de vitrificación, mencionando que

esta técnica no afecta la competencia de desarrollo embrionario, ya que los óvulos preservan el potencial de ser fertilizados y convertirse en blastocistos de alta calidad; A.E. Jones et al., 2013<sup>28</sup>; S. Cubillos et al., 2013<sup>12</sup>; L. Li et al., 2017<sup>30</sup> y producir un resultado clínico exitoso similar al uso de óvulos frescos.

Cobo et al., 2015 publicó su experiencia de 6 años utilizando óvulos vitrificados en ciclos de donación, este es el estudio más grande publicado, incluía 2,140 donantes con un total de 42,152 ovocitos vitrificados en MII (n= 3,146 ciclos de vitrificación y 3,610 procedimientos de calentamiento). De los 3,610 procedimientos de calentamiento, 3,467 terminaron en un ciclo de donación (n=3,467 ciclos de donación; n=3,003 receptoras; y n= 37,725 ovocitos supervivientes). Dentro de sus resultados encontraron una tasa de supervivencia media por procedimiento del 90.4% (38,087 de los 42,152); 37,725 ovocitos (tasa de supervivencia media por ciclo de donación del 92,6%) se asignaron a una receptora adecuada, los ovocitos restantes (n=362) no fueron donados a ningún receptor debido a una supervivencia muy baja. Otro de los objetivos del estudio fue valorar si el tiempo de almacenamiento tenía un impacto en la supervivencia y el resultado clínico, se contaba con óvulos vitrificados de 6 meses a 5 años (Se dividió en 8 grupo según el tiempo de vitrificación), estos periodos de tiempo no ocasionaron diferencias estadísticas en las tasas de supervivencia, en la tasa de implantación, embarazo clínico o en la tasa de embarazo en curso por ciclo de calentamiento. De los 3,467 ciclos de donación, se realizaron 87.9% de transferencias (9.5% no había embriones viables, 2.9% por otras razones)<sup>31</sup>.

Mientras tanto se publicó en el 2018 un estudio retrospectivo por Vitaly A. Kushnir para revisar los resultados sobre ovocitos de donantes frescos versus criopreservados en Estados Unidos informados por Society for Assisted Reproductive Technology (SART) realizados entre el 2013 – 2015, incluyo un total de 30,160 ciclos (óvulos fresco 21,832 y óvulos vitrificado 8,328) se observó que durante el período de estudio, la donación de ovocitos frescos disminuyó un 32.9% ( $p < 0.0001$ ), mientras que la de ovocitos criopreservados aumentó en un 44.4% ( $p < 0.0001$ ). A pesar de un número similar de embriones transferidos, la tasa de nacido vivo durante todo el período de

estudio fue más alta con ovocitos frescos que criopreservados por inicio de ciclo del receptor (51.1% vs. 39.7%,  $p < 0.0001$ ) y por transferencia de embriones (56.4% vs. 45.3%,  $p < 0.0001$ ). Analizaron además los resultados solo para los ciclos con transferencia de embriones único (eSET), observado que las tasas de nacido vivo por transferencia de embrión fueron del 53.7% con ovocitos frescos frente al 46.5% con ovocitos criopreservados ( $p < 0.0001$ ). Durante el período de estudio, los ovocitos frescos produjeron tasas estables de nacidos vivos por inicio del ciclo del receptor ( $p = 0.2925$ ), mientras que los ovocitos criopreservados disminuyeron significativamente año tras año ( $p = 0.0094$ ). Por lo que sugieren que se les aconseje a los pacientes utilizar ovocitos de donantes frescos ya que presentan mayores tasas de nacimientos vivos<sup>32</sup>.

## **2.6 Clasificación y calidad del blastocisto**

Elegir el embrión con el mejor potencial de implantación es esencial para asegurar a cada pareja la mayor probabilidad de lograr el embarazo después de la reproducción asistida<sup>33</sup>. Aunque el advenimiento de las tecnologías basadas en genómica puede mejorar la evaluación no invasiva de los embriones humanos in vitro, todavía no hay técnicas aplicables de rutina, por lo que las clínicas de FIV en todo el mundo continúan seleccionando embriones para las transferencias en función de su tasa de desarrollo y características morfológicas según lo evaluado por microscopía óptica<sup>34</sup>.

La capacidad de un embrión para alcanzar la etapa de blastocisto in vitro mejora la predicción del embarazo clínico y su transferencia, da como resultado tasas de nacido vivo más altas que las logradas con el mismo número de embriones en etapa de escisión<sup>33</sup>.

Existe muchas variaciones en la clasificación de ovocitos y embriones en etapa de blastocisto (Dokras et al., 1993; Gardner y Schoolcraft, 1999; Veeck y Zaninovic, 2003; Balaban et al., 2006) lo que hacen que las comparaciones entre laboratorios sean extremadamente difíciles, por lo que en el 2011 se realizó el consenso de Estambul sobre evaluación de la morfología de ovocitos y embriones.

Se llegó al consenso de que la evaluación en día 5 (blastocisto) un embrión óptimo se expandirá completamente, con una masa celular interna (ICM) prominente,



fácilmente discernible y que consta de muchas células compactadas y estrechamente adheridos y con un trofoectodermo (TE) que comprende muchas células que forman un epitelio cohesivo<sup>34</sup>.

Para el puntaje de blastocisto debería haber una combinación de etapa y puntaje. Se acordó que "eclosión" se define como la aparición obvia del TE con un blastocele cerrado a través de una zona pelúcida adelgazada, y que esta no puede evaluarse de manera confiable en embriones con eclosión asistida. Para cada una de las etapas de desarrollo, se acordó que el ICM y el TE deberían calificarse en relación con la escala Gardner A – C<sup>35</sup>, pero que se debería dar una calificación de 1–3 (en lugar de A – C) con Grado 1 equivalente a Gardner A. La razón de este cambio es apoyar la entrada de puntajes en bases de datos numéricas y facilitar el análisis estadístico<sup>34</sup>.

<b>Tabla 1. Sistema de Gardner y Schoolcraft<sup>35</sup></b>					
		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	
<b>MASA CELULAR INTERNA</b>		Muchas células unidas (empaquetadas)	Algunas células agrupadas de maneja laxa	Muy pocas células	
<b>TROFOECTODERMO</b>		Muchas células formando un epitelio cohesivo	Algunas células que forman un epitelio laxo	Muy pocas células grandes	
<b>GRADO DE EXPANSIÓN</b>					
<b>Grado 1</b> Blastocisto temprano	<b>Grado 2</b> Blastocisto	<b>Grado 3</b> Blastocisto completo	<b>Grado 4</b> Blastocisto expandido	<b>Grado 5</b> Iniciando eclosión	<b>Grado 6</b> Eclosión completa

	<b>Grado</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Descripción</b>
Etapa de desarrollo	<b>1</b>		Temprano
	<b>2</b>		Blastocisto
	<b>3</b>		Expandido
	<b>4</b>		Eclosión
Masa celular interna	<b>1</b>	Bueno	Destacado, fácilmente discernible, con muchas células compactadas y firmemente adheridas
	<b>2</b>	Justo	Fácilmente discernible, con muchas células que se agrupan libremente
	<b>3</b>	Pobre	Difícil de discernir, con pocas células
Trofectodermo	<b>1</b>	Bueno	Muchas células que forman un epitelio cohesivo
	<b>2</b>	Justo	Pocas células forman un epitelio suelto
	<b>3</b>	Bueno	Muy pocas células

Entonces la calidad embrionaria, basada en parámetros morfológicos (observaciones estáticas vinculadas a puntos de tiempo específicos), es un factor predictivo para el éxito de la fertilización in vitro. Existe una asociación entre la morfología de los blastocistos y las tasas de implantación, embarazo clínico y nacimiento vivo. Sin embargo, existe controversia en cuál de las características morfológicas del blastocisto sería el predictor más fuerte.

Sabemos que el desarrollo embrionario es un proceso dinámico, por lo que el análisis a través del lapso del tiempo nos ofrece una mejor cinética de división celular y un análisis más preciso del desarrollo del embrión, así como información detallada de la morfología dinámica en cada paso de división celular. Cobo valoro si la vitrificación de los ovocitos tenía un efecto en la calidad del embrión, a través de un análisis en el lapso del tiempo y evaluación morfocinética en 631 ciclos de donación con óvulos vitrificado (n=3,794 embriones) y 1,359 ciclos de ovocitos frescos (n=9,935 embriones). Los embriones que se originaron a partir de ovocitos vitrificados mostraron un retraso de 1 hora desde la primera división a 2 células (t2) hasta el momento de la blastulación (tB) (p<.05). No se observaron diferencias en el tiempo para alcanzar la expansión completa

o inicien la eclosión. Por último las tasas de implantación en ambas categorías fueron similares, por lo tanto, no está claro si estas alteraciones tendrían consecuencias para el potencial de desarrollo de los ovocitos vitrificados<sup>36</sup>.

Amanda Souza et al. 2019, valoró la influencia de la criopreservación en óvulos donados, en comparación con óvulos frescos. Se observó una tasa de fertilización ( $p=0.034$ ) y de embriones de alta calidad en los días 2 ( $p= 0.047$ ) y 3 ( $p= 0.003$ ) mayor con óvulos frescos. Del mismo modo el desarrollo de blastocistos (47.1% frente a 19.8%,  $p <0.001$ ) fue significativamente mayor con ovocitos fresco, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de blastocisto de alta calidad (71.2% vs. 62.0%,  $p= 0.328$ ), así como en la tasa de implantación ( $p= 0.182$ ), tasa de embarazo clínico ( $p=0.313$ )<sup>37</sup>.

Existen otras publicaciones relacionadas con la calidad embrionario pero realizados con óvulos autólogos como el de Galia Oron (2014) quien comparo 1541 ciclos frescos de FIV-SET con ovocitos no donantes, 1193 transferencias de un solo embrión de buena calidad (Grado 2) y 348 transferencias de un solo embrión de mala calidad (Regular: Grado 3 o pobre: Grado 4 (se agruparon para fines estadísticos)), lo que resultó en 563 embarazos y 440 nacimientos únicos. El objetivo fue si existe una relación entre la calidad y el resultado perinatal, el cual no revelo un mayor riesgo de complicaciones maternas o neonatales con la transferencia de un embrión de baja calidad. Se encontraron 496 (41.5%) embarazos clínicos con la transferencia de un embrión de buena calidad y 67 (19.2%) con embriones de mala calidad ( $<0.001$ ). De los 440 nacimientos vivos, 386 (87.7%) resultaron de la transferencia de un embrión de buena calidad y 54 (12.2%) de la transferencia de un embrión de baja calidad ( $P<0.001$ ). Demostrado así una fuerte asociación entre la morfología del embrión, las tasas de embarazo clínico y nacido vivo<sup>38</sup>.

## Capítulo 3. Metodología

### 3.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio retrospectivo, comparativo transversal para comparar si el porcentaje de recuperación y la calidad de los blastocistos procedentes de óvulos vitrificados es similar al de óvulos frescos en ciclos de donación desde Enero del 2014 hasta Diciembre del 2018 en el Instituto para el Estudio de la Concepción Humana en Monterrey Nuevo León.

En el centro de fertilidad se cuenta con una base de datos que incluye todos los procedimientos de Fertilización In Vitro, de esta base se obtuvo la información correspondiente de los casos de donación de óvulos y para los datos faltantes se revisaron las hojas de evolución de laboratorio de cada caso.

Criterios de inclusión:

- Ciclos de donación de óvulos con formación y transferencia embrionaria en blastocisto.

Criterios de exclusión:

- Ciclos de donación conocida.
- Pacientes con transferencia embrionaria fuera del periodo de tiempo establecido.
- Pacientes con expedientes incompletos.

Durante el periodo de estudio se realizaron un total de 567 ciclos de donación, se excluyeron 129 ciclos que no formaron blastocistos, 11 ciclos con transferencias embrionarias en día 3 y que vitrificaron embriones en día 5 y 33 ciclos que formaron blastocistos, sin transferencia embrionaria (1 ciclo de óvulo vitrificado y 32 ciclos de óvulos frescos) para un análisis final de 394 ciclos. El grupo con óvulos vitrificados

incluyó 75 ciclos y 319 ciclos en el grupo de óvulos fresco. Los ovocitos vitrificados fueron fertilizados por ICSI mientras que los óvulos frescos fueron fertilizados por FIV, ICSI o ambos. Se realizó además un análisis con los 75 ciclos de óvulos vitrificados y 61 ciclos con óvulos fresco a los que únicamente se les realizó ICSI.

### **3.2 Donantes de ovocitos y estimulación ovárica**

Todas las donantes de nuestro programa de donación de óvulos tienen una edad entre 18-25 años, sin antecedentes en su historial médico (cirugía ginecológica, antecedentes de enfermedades genéticas etc.), con un índice de masa corporal entre 18.5 y 24.9, con exámenes físico y ginecológico normal. Se realizan estudios de laboratorio como, tipo de sangre, niveles de hormona antimulleriana (niveles >2 ng/ml) y Papanicolau, se descartan enfermedades infecciosas y uso de drogas. Todas las donantes dieron su consentimiento anónimo de acuerdo con las regulaciones locales para los programas de donación de ovocitos.

Las donantes fueron sincronizadas con sus receptoras de acuerdo con su fenotipo y grupos sanguíneos. El protocolo de estimulación empleado en las donadoras fue protocolo largo, el cual inicia en la fase lútea tardía, mediante el uso de dosis subcutáneas diarias de un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (acetato de Leuprolide), los primeros tres días de la menstruación se realizan niveles séricos de estradiol y el día 2 o 3 del ciclo se inició la estimulación ovárica con rFSH o hMG o una combinación de ambas, la dosis administrada se ajustó a cada donante, el crecimiento folicular se controló mediante ecografía y cuando los folículos alcanzaron un tamaño de 17-18 mm de diámetro se administró gonadotropina coriónica humana y se tomaron niveles de estradiol previo a la administración de este, 34 horas después se realizó la captura de ovocitos bajo anestesia, utilizando una guía de ultrasonido transvaginal.

### 3.3 Procedimiento de laboratorio

#### Vitrificación

Todos los ovocitos se desnudaron mecánicamente aproximadamente a las 36 horas después del desencadenante de la maduración de ovocitos. Para la desnudación se prepara previamente una caja con medio g-mops (Vitrolife ®) y Hyaluronidasa (Irvine Scientific ®) y se deja calentar dentro de la incubadora a 37° C. Durante un máximo de 1 minuto se manipulan los cúmulos hasta que la enzima rompa los enlaces de las células de la granulosa y estas se separen, después se lavan en medio g-mops y se regresan a la caja de cultivo (CSC, Irvine Scientific ®) donde permanecen en la incubadora hasta el momento de la vitrificación a una temperatura de 37° C con un ambiente 7% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>. La madurez se evaluó mediante un microscopio Invertido (Nikon). Todos los ovocitos clasificados como metafase II se vitrificaron utilizando el Set de Vitrificación (Cryotech®).

Los ovocitos se colocaron en 300 µl de solución de equilibrio (ES) durante 12 minutos después se lavan en 2 pozos con solución de vitrificación (VS) permaneciendo 20-40 segundos en el primer pozo y 10-20 segundos en el segundo pozo ambos con 300 µl de medio (VS), inmediatamente se toman con el stripper y se colocan en el Cryotop en ≤1 µl de medio. Los ovocitos se almacenaron en nitrógeno líquido.

#### Desvitrificación

Los ovocitos se desvitrificaron utilizando el medio Set Warming de Cryotech, previo a la desvitrificación se coloca la solución TS en la incubadora a una temperatura de 37° C. Todas las demás soluciones se utilizaron a temperatura ambiente.

Para iniciar el proceso de desvitrificación se saca rápidamente el Cryotech del nitrógeno líquido y se sumerge en 1 ml de la solución TS durante 1 minuto. Los ovocitos se trasladan al siguiente pozo que contiene 300 µl de la solución diluyente (DS) durante 3 minutos y luego se trasladan al pozo que contiene 300 µl de la solución de lavado (WS) y ahí permanece durante 5 minutos, después se pasa al segundo pozo que contiene la misma solución de lavado (WS) durante 1 minuto. Una vez transcurriendo el último minuto en la solución de lavado se toman los ovocitos y se trasladan al medio de cultivo

(CSC, Irvine Scientific ®) donde permanecen en la incubadora hasta el momento del procedimiento a una temperatura de 37° C con un ambiente 7% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>.

#### Inseminación, fertilización, calidad embrionaria y transferencia

En el grupo de ovocitos en fresco, todos los ovocitos fueron inseminados o inyectados 5 horas después de la recuperación, dependiendo de las características seminales de la pareja. En el grupo de ovocitos vitrificados, se evaluó la viabilidad de los óvulos 2 horas posteriores a la desvitrificación para ser fertilizados con ICSI.

La fertilización se evaluó 16 – 18 horas más tarde, los cigotos que exhibían dos pronúcleos se consideraron fertilizados, los embriones se cultivaron en microgotas y se realizó la valoración del número de blastómeros, su simetría, la fragmentación citoplasmática y las apariciones de la multinucleación en día 2, en día 3 se valoró la compactación temprana, en día 4 no se realiza valoración embrionaria y en día 5 se utiliza el Sistema de Gardner y Schoolcraft modificado (Sistema utilizado en IECH) para definir la calidad embrionaria (Tabla 3), posteriormente se llevó a cabo la transferencia embrionaria guiada con ultrasonido con un máximo de 2 embriones. Para los embriones supernumerarios que cumplían las características necesarias se realizó vitrificación.

<b>Tabla 3. Clasificación de blastocisto en IECH</b>					
		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	
<b>MASA CELULAR INTERNA</b>		Muchas células unidas (empaquetadas)	Algunas células agrupadas de maneja laxa	Muy pocas células	
<b>TROFOECTODERMO</b>		Muchas células formando un epitelio cohesivo	Algunas células que forman un epitelio laxo	Muy pocas células grandes	
<b>GRADO DE EXPANSIÓN</b>					
Blastocisto temprano	Blastocisto	Blastocisto completo	Blastocisto expandido	Iniciando eclosión	Eclosión completa
<b>GRADO 3</b>	<b>GRADO 2</b>	<b>GRADO 1</b>			

Además, para nuestro estudio dividimos los blastocistos según su calidad, como, buena, regular y pobre (Tabla 4) según la clasificación previamente realizada por el laboratorio.

<b>Tabla 4. Clasificación calidad embrionaria</b>		
<b>Grado del embrión</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Calidad</b>
1	1AA, 1AB, 2AA	<b>Buena</b>
2	2AB, 1BA, 2BA, 1BB, 2BB, 3BB	<b>Buena</b>
3	Cuando la ICM y el TE se clasifica como C	<b>Regular</b>
4	Mórula compacta	<b>Pobre</b>

### **3.4 Evaluación del embarazo**

El embarazo se confirmó por el nivel de B-HCG 14 días posteriores a la transferencia, se confirmó el embarazo clínico por la presencia de la FCF, se siguió el embarazo hasta su desenlace (HRM, aborto o nacido vivo).

### **3.5 Variables y Análisis estadístico**

Se investigaron las siguientes variables cuantitativas: Edad de la donadora y de la receptora, número de óvulos totales, MII, MI, GV, total de óvulos que fueron fertilizados o inyectados, fertilización total, embriones día 3, 5 y 6, número de embriones transferidos y vitrificados.

Las variables cualitativas que se investigaron fueron: óvulo fresco o vitrificado, el tipo de procedimiento (FIV, ICSI o ambos), factor masculino, calidad embrionaria de blastocisto, calidad del embrión trasferido, prueba de embarazo, presencia de saco gestacional y frecuencia cardiaca, vía de desembarazo, nacido vivo, embarazo gemelar.

Con la información obtenida se realizó una base de datos que contaba con las variables cuantitativas y cualitativas previamente descritas. Posteriormente los resultados obtenidos se recabaron en una base de datos desarrollada en programa Excel, para su posterior análisis mediante el programa R Statistic; se obtuvieron, de todas las variables evaluadas, los estadísticos descriptivos tradicionales, tales como las medidas de tendencia central (media, mediana y moda), medidas de dispersión (varianza,



desviación estándar y coeficiente de variación) y medidas de posición (cuartiles, quintiles y deciles) en el caso de las variables cuantitativas, así como las frecuencias observadas en las variables de tipo cualitativas.

Los valores de estudio fueron contrastados según el grupo, óvulo fresco o vitrificado mediante pruebas de hipótesis para medias (T de Student) y prueba de Fisher o distribución  $\chi^2$  para las variables categóricas. La obtención de asociación y correlación se realizará con Pearson o Spearman (según distribución) a la misma confiabilidad.

Se realizó además un subgrupo para evaluar los óvulos vitrificados con los óvulos frescos fertilizados con ICSI.

## Capítulo 4. Resultados

Durante el periodo de estudio establecido de Enero del 2014 a Diciembre del 2018 en el centro de fertilidad IECH, se realizaron un total de 394 ciclos de donación con formación y transferencia de blastocisto, incluyendo 75 ciclos con óvulos vitrificados y 319 ciclos con óvulos frescos.

No se encontraron diferencias en las edades ( $40.41 \pm 4.83$ ,  $p=0.9341$ ) de las receptoras entre los grupos estudio, además, observamos esto de forma similar para las edades de las donadoras ( $23.09 \pm 0.94$ ,  $p=0.4073$ ) (Tabla 5).

No se encontró diferencia entre las muestras espermáticas ( $1.31 \pm 0.47$ ,  $p=0.1795$ ) en ambos grupos. Se observó un porcentaje similar de muestras de eyaculado (87.67%,  $p=0.8509$ , OR 1.1679), muestra congelada (1.37%,  $p=0.9999$ , OR 0.619) y muestra heteróloga (10.96%,  $p=0.8341$ , OR 1.0667).

Encontramos una tasa de supervivencia de los óvulos vitrificados del 93.66%. Un menor número de óvulos fueron asignados para las receptoras en el grupo de óvulos vitrificados ( $7.68 \pm 1.22$ ,  $12.15 \pm 3.1$ , [fresco],  $p < 0.001$ ) de forma significativa, del mismo modo un menor número de óvulos estuvieron disponibles para la fertilización en el grupo de óvulos vitrificados ( $7.19 \pm 1.42$ ,  $11.42 \pm 2.76$  [fresco],  $p < 0.001$ ) de forma significativa, el porcentaje de fertilización fue similar en ambos grupos ( $68.69 \pm 19.73$ ,  $67.6 \pm 19.01$  [fresco],  $p=0.6605$ ), al igual que el porcentaje de desarrollo en día 3 ( $90.13 \pm 16.58$ ,  $p=0.3123$ ) (Tabla 5).

<b>Tabla 5. Características demográficas y datos embriológicos</b>			
	<b>Óvulo vitrificado M, DE</b>	<b>Óvulo fresco M, DE</b>	<b>P</b>
<b>Edad receptora</b>	40.41 ±4.83	40.46 ±4.75	0.9341
<b>Edad donadora</b>	23.09 ±0.94	22.59 ±2.01	0.4073
<b>No. de óvulos asignados</b>	7.68 ±1.22	12.15 ±3.1	<b>&lt;0.001</b>
<b>Tasa de supervivencia (%)</b>	93.66 %	N/A	
<b>No. de óvulos disponibles para fertilización</b>	7.19 ±1.42	11.42 ±2.76	<b>&lt;0.001</b>
<b>No. de óvulos fertilizados</b>	4.89 ±1.58	7.67 ±2.7	<b>&lt;0.001</b>
<b>Tasa de fertilización</b>	68.69 ±19.73	67.6 ±19.01	0.6605
<b>Número de embriones en día 3</b>	4.36 ±1.67	7.02 ±2.55	<b>&lt;0.001</b>
<b>Porcentaje de desarrollo día 3</b>	90.13 ± 16.58	91.9 ± 12.82	0.3123
<b>Número de embriones en día 5</b>	2.49 ±1.19	3.88 ±1.99	<b>&lt;0.001</b>
<b>Porcentaje de desarrollo día 5</b>	35.23 ±15.03	34.56 ±16.44	0.7502

Encontramos un porcentaje similar de formación a blastocisto en ambos grupos (35.23 ±15.03, 34.56 ±16.44 [fresco], p= 0.7502) (Tabla 5). Al realizar un análisis por el grado de blastocisto, no observamos diferencias en el porcentaje de formación en los grados uno (16.91 ±7.09, p= 0.9472), dos (17.18 ±7.82, p= 0.1214) y tres (20.43 ±9.49, p= 0.057), pero este último presentó una mayor tendencia en el grupo de óvulos vitrificados, se encontró un mayor porcentaje de embriones grado cuatro en el grupo de óvulos vitrificados (23.23 ±10.05, 14.62 ±7.99, [fresco], p= <0.001) (Tabla 6).

Al catalogar los blastocistos por calidad, observamos que el grupo de óvulos vitrificados tuvo un menor porcentaje de blastocistos de buena calidad (47.95%, 60.73% [fresco], p =0.0488, OR 0.5957) y un mayor porcentaje de embriones de pobre calidad (19.18%, 5.61% [fresco], p= <0.001, OR 3.992), mientras el porcentaje de blastocistos de calidad regular fue similar en ambos grupos (32.88%, 33.66% [fresco], p= .9999, OR 0.9652) (Tabla 6).

No se encontró diferencia en el porcentaje de cantidad de embriones transferidos, con uno (21.33%, p= 0.7464, OR 1.1425) o dos (78.6%, p= 0.7464, OR 0.8752) embriones en ambos grupos.

Se encontró un menor porcentaje de transferencias con blastocistos de buena calidad en el grupo vitrificado (64.86%, 84.28% [fresco],  $p = < 0.001$ , OR 0.3444) de forma significativa; se observó un mayor porcentaje de transferencias con blastocistos de calidad regular en el grupo vitrificado (25.86%, 13.52%,  $p = 0.0133$ , [fresco], OR 2.2093), así como un mayor porcentaje de transferencias con embriones de pobre calidad en el grupo vitrificado (9.46%, 2.2%, [fresco]  $p = 0.0073$ , OR 4.6418) (Tabla 6).

<b>Tabla 6. Grado y calidad de blastocistos</b>					
	<b>Óvulo vitrificado</b>	<b>Óvulo fresco</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC</b>
	<b>M, DE</b>	<b>M, DE</b>			
<b>Porcentaje de blastocistos grado 1</b>	16.91 ±7.09	16.77 ±9.93	0.9472		
<b>Porcentaje de blastocistos grado 2</b>	17.18 ±7.82	14.49 ±8.64	0.1214		
<b>Porcentaje de blastocistos grado 3</b>	20.43 ±9.49	17.57 ±9.45	0.057		
<b>Porcentaje de embriones grado 4</b>	23.23 ±10.05	14.62 ±7.99	<b>&lt;0.001</b>		
	<b>N, %</b>	<b>N, %</b>			
<b>Blastocistos buena calidad</b>	35 (47.95)	184 (60.73)	<b>0.0488</b>	0.5957	0.3564-0.9958
<b>Blastocistos regular calidad</b>	24 (32.88)	102 (33.66)	0.9999	0.9652	0.5606-1.6619
<b>Embriones pobre calidad</b>	14 (19.18)	17 (5.61)	<b>&lt;0.001</b>	3.992	1.8653- 8.5433
<b>TE con blastocistos de buena calidad</b>	48 (64.86)	268 (84.28)	<b>&lt;0.001</b>	0.3444	0.1958-0.6058
<b>TE con blastocistos de regular calidad</b>	19 (25.86)	43 (13.52)	<b>0.0133</b>	2.2093	1.1973-4.0768
<b>TE con embriones de pobre calidad</b>	7 (9.46)	7 (2.2)	<b>0.0073</b>	4.6418	1.5757-13.674

No se encontró diferencia en la tasa de implantación (34.09 %  $p = 0.1094$ ) entre ambos grupos, así como en la tasa de embarazo (49.33%, 61.76% [fresco]  $p = 0.0512$ , OR 0.603), pero, se observó una mayor tendencia a presentar embarazo en los ciclos de óvulos frescos, no se encontró diferencia en la tasa de embarazo clínico (48%,  $p = 0.3047$ , OR 0.7562) o en la tasa de embarazo en curso (97.29%,  $p = < 0.2126$ , OR

4.0678), así como en, HMR (2.78%,  $p= 0.209$ , OR 0.2508), aborto (8.33%,  $p= 0.4666$ , OR 1.5091) o en la tasa de nacido vivo por ciclo (86.11%, 82.39 % [fresco]  $p= <0.8077$ , OR 1.3255), no se observaron diferencias en el porcentaje de nacido vivo único (70.97%,  $p= < 0.833$ , OR 1.1723) o gemelar (29.03%,  $p= < 0.833$ , OR 0.853). El grupo de óvulos fresco presentó 1 embarazo ectópico y 1 óbito (Tabla 7).

<b>Tabla 7. Resultados clínicos</b>				
	<b>Óvulo vitrificado N, %</b>	<b>Óvulo fresco N, %</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>
<b>Tasa de implantación</b>	34.09	42.96	0.1094	
<b>Tasa de embarazo</b>	37 (49.33)	197 (61.75)	0.0512	0.603
<b>Tasa de embarazo clínico</b>	36 (48)	177 (54.97)	0.3047	0.7562
<b>Tasa de embarazo curso</b>	36 (97.3)	177 (89.85)	0.2126	4.0678
<b>HMR</b>	1 (2.78)	18 (10.23)	0.209	0.2508
<b>Aborto</b>	3 (8.33)	10 (5.68)	0.4666	1.5091
<b>Tasa de nacido vivo por ciclo</b>	31 (86.11)	145 (82.39)	0.8077	1.3255
<b>NV único</b>	22 (70.97)	98 (67.59)	0.833	1.1723
<b>NV gemelar</b>	9 (29.03)	47 (32.41)	0.833	0.1811

Encontramos un menor porcentaje de ciclos con embriones excedentes para vitrificación en el grupo de óvulos vitrificados (20%, 57.99 %, [fresco],  $p= < 0.001$ , OR 0.1811), esto podría tener relación con la diferencia de óvulos asignados en cada grupo.

Se realizó además un análisis comparativo entre los grupos que únicamente se les realizó el mismo proceso de fertilización (ICSI), incluyó 75 ciclos de óvulos vitrificado y 61 ciclos con óvulos frescos.

Observamos una mayor tasa de fertilización en el grupo de óvulos vitrificados (68.69%, 61.07% [fresco],  $p= 0.0076$ ), mientras la tasa de formación de blastocisto fue menor en el grupo de óvulo vitrificado (53.09%, 67.13% [fresco],  $p= < 0.001$ ). Encontramos un mayor porcentaje de embriones de pobre calidad en el grupo de óvulos vitrificados (19.18%, 5.17% [fresco],  $p= 0.0195$ , OR 4.3503), pero no encontramos

diferencias en el porcentaje de blastocistos de buena (47.95%, 46.55% [fresco], p= 0.9999, OR 1.0575) y regular calidad (32.88%, 48.28% [fresco], p= 0.1053, OR 0.5248) (Tabla 8).

El número de embriones transferidos fue similar en ambos grupos. No difirió la cantidad de transferencias con blastocistos de buena calidad (64.86%, p= 0.3505, OR 0.6564) y regular calidad (25.86%, p= 0.8409, OR 1.1597), así como de embriones de pobre calidad (9.46%, p= 0.1835, OR 3.0821) (Tabla 8).

<b>Tabla 8. Formación y calidad de blastocistos, análisis exclusivo con ciclos de ICSI</b>					
	<b>Óvulo vitrificado</b>	<b>Óvulo fresco</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa de fertilización</b>	68.69	61.07	<b>0.0076</b>		
<b>Porcentaje de desarrollo día 5</b>	53.09	67.13	<b>&lt;0.001</b>		
<b>Blastocistos buena calidad</b>	35 (47.95)	27 (46.55)	0.9999	1.0575	0.5301-2.1098
<b>Blastocistos regular calidad</b>	24 (32.88)	28 (48.28)	0.1053	0.5248	0.2581-1.0671
<b>Embriones pobre calidad</b>	14 (19.18)	3 (5.17)	<b>0.0195</b>	4.3503	1.1857-15.961
<b>TE con blastocistos de buena calidad</b>	48 (64.86)	45 (73.77)	0.3505	0.6564	0.312 - 1.381
<b>TE con blastocistos de regular calidad</b>	19 (25.86)	14 (22.95)	0.8409	1.1597	0.525 - 2.5618
<b>TE con embriones de pobre calidad</b>	7 (9.46)	2 (3.28)	0.1835	3.0821	0.6161 - 15.418

No se encontró diferencia en la tasa de embarazo (49.33%, p= 0.0512, OR 0.603), así como en la tasa de embarazo clínico (48%, p= 0.8632, OR 0.8932), embarazo en curso (97.29%, p= < 0.2126, OR 4.0678), HMR (2.78%, p= 0.329, OR 0.2667), aborto (8.33%, p= 0.6178, OR 2.7273) y tasa con nacido vivo por ciclo (86.11%, 87.1% [fresco], p= < 0.999, OR 0.9185), no se observaron diferencias en el porcentaje de pacientes con nacido vivo único (70.97%, p= 0.3784, OR 0.5556) o gemelar (20.03%, p= 0.3784, OR 1.8) (Tabla 9).

<b>Tabla 9. Resultados clínicos, análisis exclusivo con ciclos de ICSI</b>				
	<b>Óvulo vitrificado N, %</b>	<b>Óvulo fresco N, %</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>
<b>Tasa de embarazo</b>	37 (49.33)	37 (60.6)	0.2266	0.6316
<b>Tasa de embarazo clínico</b>	36 (48)	31 (50.82%)	0.8632	0.8933
<b>Tasa de embarazo en curso</b>	36 (97.3)	31 (83.78)	0.107	6.967
<b>HMR</b>	1 (2.78)	3 (9.67)	0.329	0.2667
<b>Aborto</b>	3 (8.33)	1 (3.22)	0.6178	2.7273
<b>Nacido vivo</b>	31 (86.11)	27 (87)	0.9999	0.9185
<b>NV único</b>	22 (70.9)	22 (81.4)	0.3784	0.5556
<b>NV gemelar</b>	9 (29)	5 (18.5)	0.3784	1.8

Encontramos un menor porcentaje de ciclos con embriones excedentes para vitrificación en el grupo de óvulos vitrificados (20%, 39.68 %, [fresco],  $p = < 0.0143$ , OR 0.38), esto probablemente por la diferencia de óvulos asignados en cada grupo.

## Capítulo 5. Análisis y discusión de resultados

El resultado clínico exitoso de cualquier programa de donación de óvulos requiere un endometrio receptivo y la transferencia de embriones de alta calidad. Por lo tanto, la disponibilidad de buenos ovocitos y en consecuencia de embriones de alta calidad, es un factor crucial para la eficacia de los programas de donación de óvulos.

La finalidad de nuestro estudio fue detectar si en los ciclos de donación de óvulos, el uso de ovocitos vitrificados presenta resultados similares al de ovocitos frescos. Durante el periodo de estudio establecido realizamos 394 ciclos con formación y transferencia embrionaria en blastocisto, de ellos, el 19.03% fueron ciclos con óvulos vitrificado (n=75) y 80.96% con óvulos frescos (n=319).

Nuestro estudio ha confirmado la efectividad del proceso de vitrificación ya que encontramos una tasa de supervivencia posterior a la desvitrificación del 93.66%, cifras similares a las que se mencionan en la literatura que van desde un 85 a un 97%.

Realizamos un análisis con todos los ciclos, el cual incluía los óvulos vitrificados fertilizados con ICSI y los óvulos frescos que fueron fertilizados con FIV, ICSI o ambos de acuerdo con las características de la pareja, además realizamos un segundo análisis para comparar los óvulos vitrificados y frescos fertilizados solamente con ICSI, es importante señalar que no hubo diferencias entre las diferentes muestras espermáticas entre ambos grupos y que hay estudios que comparan los óvulos vitrificados con óvulos frescos fertilizados con ambas técnicas y solamente con ICSI.

Descubrimos que no hubo diferencias estadísticamente significativas en las tasas de fertilización en nuestro análisis general entre los ovocitos vitrificados y frescos (68.69% vs 67.6%), esto es similar a lo que han publicado otros investigadores, lo cual nos puede sugerir que los óvulos desvitrificados conservan su integridad tanto morfológica como funcional, las tasas de fertilización publicadas por Cobo et al., 2008, 2010, 2015, Sole et al., 2013, García et al., 2010, S. Domingues et al., 2017, van del 70% al 84% para óvulos vitrificados y del 73% al 87% para óvulos fresco; en el análisis de fertilización por ICSI, observamos una mayor tasa de fertilización en el grupo de



óvulos vitrificados (68.69%,  $p=0.0076$ ). Observamos un desarrollo embrionario similar para los embriones de día 3 (90.13% vs 91.9%) como lo menciona Cobo et al., 2010 (87.3% vs 88.2%) y Krinos et al., 2011, del mismo modo la tasa de formación de blastocisto fue similar en ambos grupos en nuestro análisis general (35.25% vs 34.56%) tal y como lo menciona García et al., 2010, con tasa de blastocisto del 41.3% y 45.3%, M. Alikani refiere tasas de 30 % vs 27%; en nuestro análisis con óvulos fertilizados solo con ICSI encontramos un menor porcentaje de formación de blastocistos en el grupo de óvulo vitrificado (53.09%, 67.13% [fresco],  $p<0.001$ ), S. Domingues et al., 2017 refiere tasas similares de formación de blastocisto (48% y 51.6%) utilizando solo ICSI, al igual que L. Li et al., 2017 con tasa similares de formación de blastocisto (56% vs 59%).

Cuando dividimos los blastocistos por grado no observamos diferencias entre los grados uno, dos y tres entre los grupos de estudio, pero encontramos un mayor porcentaje de embriones grado cuatro en el grupo de óvulos vitrificados (23%, 14%, [fresco],  $p<0.001$ ). Al clasificar los embriones por calidad, incluimos a los grado 1 y 2 como blastocistos de buena calidad, al agruparlos de esta forma, observamos que el grupo vitrificado presento menor porcentaje de blastocistos de buena calidad (47.9%, 60.73%, [fresco],  $p=0.0488$ ), mientras que García et al., 2010 refiere tasas similares de blastocisto de buena calidad (75% vs 77%) (definidos como buena calidad los blastocistos que presentaran ICM y TE tipo A o B), los blastocistos grado 3 se clasificaron como regulares siendo similares para ambos grupos y los embriones grado 4 los clasificamos como pobres, presentando un mayor porcentaje de estos con óvulos vitrificados. En nuestro análisis con óvulos fertilizados solo con ICSI, el porcentaje de blastocistos de buena y regular calidad fue similar en ambos grupos, pero el porcentaje de embriones de pobre calidad fue mayor con óvulos vitrificados de manera similar al análisis principal.

No se encontró diferencia en la transferencia de 1 o 2 embriones entre ambos grupos, es importante mencionar que la transferencia de 2 embriones se realizó en el 78% de los ciclos con óvulos vitrificados y en 80 % de los ciclos con óvulos fresco, lo cual se verá reflejado en un aumento en las tasas de embarazo múltiple. Realizamos un

menor porcentaje de transferencias con embriones de buena calidad en el grupo vitrificado (64%, 84%, [fresco],  $p= 0.0488$ ) y un mayor porcentaje de transferencias con embriones de regular calidad (25.8%, 13.52%, [fresco],  $p=0.0133$ ) y pobre calidad (9.4%, 2.2%, [fresco],  $p=0.0073$ ) en el grupo vitrificado. En el análisis con óvulos fertilizados solo con ICSI, observamos porcentajes similares de transferencias con embriones de buena, regular y pobre calidad.

No encontramos diferencias estadísticas en la tasa de implantación (34% vs 42%), tal y como lo menciona M. Alikani et al., 2014 (33% y 43%) y S. Domingues et al., 2017 (36.4% vs 40%); no observamos diferencias en la tasa de embarazo, pero se observó una mayor tendencia de embarazo en el grupo fresco (49.33%, 61.75% [fresco],  $p= 0.0512$ ), García et al., 2010 refiere tasas similares embarazo en ambos grupos (61% vs 60%), del mismo modo, no encontramos diferencias en las tasas de embarazo clínico (48% vs 54.9%), al igual que S. Domingues et al., 2017 (59% vs 60%), no observamos diferencias en embarazo en curso, HMR, y aborto, obtuvimos una tasa de nacido vivo por ciclo similar en ambos grupos (86.1% vs 82.3%), con porcentaje similares de nacidos vivos únicos y gemelares, mencionando que este último fue alrededor del 30%, reflejo de las transferencias embrionarias de más de un embrión, tasa por arriba de lo deseado. En el análisis de ICSI tampoco observamos diferencias en las tasas previamente mencionadas. Es importante mencionar que, en los estudios previamente descritos, siempre se utilizaron blastocistos, pero ninguno publicó resultados de nacidos vivos, mientras tantos otros autores que transfirieron en día 3 refieren tasas de nacido vivo similar en ambos grupos; Kushnir menciona en su publicación del 2018 los resultados de SART (2013 – 2015), los cuales reportan una mayor tasas de nacido vivo con ovocitos frescos en comparación con vitrificados por inicio de ciclo de la receptora (51.1% vs. 39.7%,  $p<0.0001$ ).

Encontramos un menor porcentaje de ciclos con embriones excedentes para vitrificación en el grupo de óvulos vitrificados tanto para el análisis general (20%, 57.99%, [fresco],  $p= <0.001$ ), así como en el análisis del ICSI (20%, 39.6%, [fresco],  $p= <0.0143$ ), esto podría tener relación con la cantidad de óvulos asignados en cada grupo.

Nuestro estudio nos permitió analizar el impacto de la vitrificación en la funcionalidad del ovocito y su capacidad para producir blastocistos y comparar la calidad de estos con los óvulos frescos, así como observar los resultados clínicos como tasa de implantación, embarazo clínico y nacido vivo.

Estos resultados no solo apoyan el uso de óvulos vitrificados en donación, si no también nos sirve para apoyar otras técnicas como preservación de fertilidad, acumulación de óvulos en pacientes con baja respuesta y para la vitrificación de óvulos excedentes cuando no se desea vitrificar embriones.

## Capítulo 6. Conclusiones

En la actualidad, la donación de ovocitos sigue siendo un componente importante en el tratamiento de la infertilidad, siendo un tratamiento esencial para las mujeres con función ovárica deficiente o cuando está ausente.

La donación de ovocitos frescos es una tecnología probada de FIV, mientras el uso de óvulos vitrificados ha tomado fuerza gracias a las mejoras en el proceso de vitrificación, así como que, es un proceso de mayor simplicidad.

Definitivamente tenemos una buena tasa de supervivencia para óvulos vitrificados y, al comparar los resultados embriológicos, observamos que los óvulos vitrificados presentan un porcentaje de fertilización similar a los óvulos frescos, además presentan el mismo potencial de desarrollo embrionario en día 3 y blastocisto. En nuestro análisis general, en el grupo de óvulos vitrificados presentamos de forma significativa, un menor porcentaje de formación y transferencia de blastocistos de buena calidad y un mayor porcentaje de formación y transferencia de embriones de pobre calidad, esto, no afectó nuestros resultados clínicos ya que, las tasas de implantación, embarazo clínico y nacido vivo fueron similares en ambos grupos.

Por lo tanto, utilizar óvulos vitrificados en ciclos de donación representa una buena alternativa para las parejas candidatas a este tipo de procedimiento, recordando además de las ventajas de simplicidad que tiene sobre el ciclo fresco.

Algo que definitivamente tenemos que mencionar es que el grupo vitrificado presentó menos ciclos con embriones excedentes para vitrificación, y por lo tanto esto podría cambiar nuestras tasas de embarazo, pero esto se debería analizar en próximos estudios.

## Bibliografía

1. Alexis P. Melnick, M. a. (2018). Oocyte donation: insights gleaned and future challenges. *Fertility and Sterility*, 988-993.
2. Steven R. Lindheim, M. M. (2018). Oocyte donation: lessons from the past, directions for the future. *Fertility and Sterility*, 979-980.
3. Irene Woo, R. J. (2018). Egg and Embryo Donation. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, Volumen 5, Pag 40-49.
4. Craig Niederberger M.D., A. P. ( 2018 ). Forty years of IVF. *Fertility and Sterility*, 185-324.
5. Chen. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*.
6. Catrin E. Argyle, J. C. (2016). Oocyte cryopreservation: where are we now? *Human Reproduction Update*, 440–449.
7. S. Seshadria, S. H. (2018). Clinical outcomes of a vitrified donor oocyte programme: A single UK centre experience. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 136–140.
8. MediCine, A. S. (2013). Recommendations for gamete and embryo donation: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, Volumen 99, Número 1, Pag 47-62.
9. Ana Cobo, J. R.-C. (2011). Oocyte cryopreservation for donor egg banking. *Reproductive BioMedicine Online*, Vol 23, NO 3, Pag 341-346.
10. Klenov, S. L. (2018 ). Live birth and multiple birth rates in US in vitro fertilization treatment using donor oocytes: a comparison of single-embryo transfer and double-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*, 1657–1664.
11. Thais Domingues., A. P. (2017 ). Egg donation of vitrified oocytes bank produces similar pregnancy rates by blastocyst transfer when compared to fresh cycle. *Journal Assisted Reproduction Genet*, 1553–1557.
12. S. Cubillos, S. S. (2008). Successful vitrified oocyte donation program with blastocyst transfer. One year of follow up study in Mexico city. *Fertility and Sterility*, S72-S72.
13. Zsolt P. Nagy M.D., P. C.-C.-L. (2009). Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking. *Fertility and Sterility*, Vol. 92, No.2.

14. Medicine, P. C. (2013). Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility and Sterility*, 37-43.
15. Neelam Potdar, T. A. (2014). Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 159-176.
16. M. Alikani, M. C. (2014). A comparison of fresh and vitrified oocyte donation cycles to determine efficiency and limitations of each treatment approach. *Fertility and Sterility*, 126-127.
17. L.A. Marshalla, J. L. (2017). Fertilization and blastulation success of vitrified donor oocytes is cultures its own donor oocytes. *Fertility and strility*, e18.
18. .I. Kort, D. S.-l. (2010). Evaluation of the first one hundred and thirty one live births following oocyte cryopreservation from a single ivf program utilizing a standardized vitrification technique. *Fertility an Sterility*, S108.
19. Alexander M. Quaas, M. a. (2018). The current status of oocyte banks: domestic and international perspectives. *Fertility and Sterility* , 1203-1208.
20. Neelke De Munck, G. V. (2017). Safety and efficiency of oocyte vitrification. *Cryobiology*, 119 -127.
21. Saumet J, P. A. (2018). No. 356-Egg Freezing for Age-Related Fertility Decline. *Journal Obstetricians and Gynaecologists of Canada*, 356-368.
22. Cobo A, D. C. (2011). Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta- analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility*, 277-285.
23. Ana Cobo, M. M. (2010). Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human Reproduction*, 2239–2246.
24. M. Solé, J. S. (2013). 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*, 2087–2092.
25. Javier I. García, L. N.-P.-H. (2011). Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Human Reproduction*, 782–790.

26. Ana Cobo, P. M. (2008). Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertility and Sterility* , 1657–64.
27. Krinos M. Trokoudes, M. C. (2011). Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertility and Sterility*, Vol. 95, No.6.
28. E .Jones, J. W. (2013). Fresh versus vitrified: results of an egg donor program comparing sibling oocyte outcomes. *Fertility and Sterility*, 95.
29. Braga DP, S. A. (2016). Freeze-all, oocyte vitrification, or fresh embryo transfer? Lessons from an egg-sharing donation program. *Fertility and Sterility* , 615-622.
30. L. Li, E. F. (2017). Frozen thawed donor oocytes have equivalent embryo developmental competency compared to fresh donor oocytes – a single center experience from pacific fertility egg bank (PFEB). *Fertility and Sterility*, 30-31.
31. Cobo A, G. N. (2015). Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertility and Sterility*, 1426-1434.
32. Kushnir VA, D. S. (2018). New national outcome data on fresh versus cryopreserved donor oocytes. *Journal of Ovarian Research*.
33. Van den Abbeel E1, B. B. (2013 ). Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reproductive BioMedicine Online*, 353-361.
34. Embryology, A. S. (2011). Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reproductive BioMedicine Online*, 632-646.
35. David K. Gardner, D. M. (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*, 1155–8.
36. Cobo A, C. A. (2017). Effect of oocyte vitrification on embryo quality: time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. *Fertility and Sterility* , 491-497.
37. Amanda Souza Setti MS, D. P. (2019). Fresh oocyte cycles yield improved embryo quality and surplus embryo cryopreservation rates compared to frozen oocyte cycles in an egg-sharing donation programme. *Fertility and Sterility*, 120 -121.
38. Galia Oron\*, W.-Y. S. (2014). The association between embryo quality and perinatal outcome of singletons born after single embryo transfers: a pilot study. *Human Reproduction*, 1444–1451