

TESIS DOCTORAL

CRIOPRESERVACIÓ EN LES TÈCNIQUES DE REPRODUCCIÓ ASSISTIDA HUMANA

Miquel Solé Inarejos

Sota la direcció de:

Dr. Josep Santaló i Pedro

Dra. Anna Veiga Lluch

Facultat de Biociències. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Ginecologia, Obstetrícia i Reproducció. Servei de Medicina de la Reproducció. Hospital Universitari Quirón Dexeus

Bellaterra, setembre de 2014

Als meus pares als que mai podre agrair tot el que han fet per mi,
pels valors que m'han inculcat i el seu recolzament incondicional.

Al meu germà, per estar sempre al meu costat

A la Sònia

Agraïments

A l'Anna Veiga, per la seva amistat, confiança i empenta que ha motivat, sense dubte, la meua carrera professional al llarg de tots aquests anys.

Al Dr Josep Santaló per la seva proximitat, paciència y elocuencia que han fet possible presentar aquesta tesis.

Al Nacho Rodriguez per deixar-me acostar al intangible món de l'estadística al llarg de tots aquests anys.

A l'Eva Salas per facilitar-me tot el coneixement científic “per ahir”.

A la Monica Parriego per persuadir-me a entrar al mon dels multinucleats.

A la Dra. Montse Boada pels seus consells d'impagable valor.

Al Dr. Coroleu per la seva confiança i permetre'm formar part del seu equip

Al Dr. Barri, que amb els seus reptes i exits, han motivat a que tot l'equip segueixi obrint camí en el camp de la recerca i la innovació.

A l'equip de biòlogues del laboratori que han estat sempre disposades a donar-me un “cable” i fer-me més fàcil el tortuós camí del doctorat.

A tot l'equip del Servei de Medicina de la Reproducció de l'Insitut Dexeus per formar part dels meus inicis, el meu present i seguir-me recolzant en els meus projectes.

ÍNDEX

1. Introducció	8
1.1. Antecedents històrics	9
1.2. Conceptes bàsics de criobiologia	11
1.2.1 Refredament	11
1.2.2 Els crioprotectors	12
1.3. Tècniques de criopreservació.....	15
1.3.1 Congelació lenta.....	15
1.3.2 Vitrificació	16
1.4. Criopreservació en Reproducció Assistida.....	18
1.4.1 Oòcits	18
1.4.2 Embrions primerencs	20
1.4.3 Blastocists	21
2. Objectius.....	23
2.1 Desenvolupament d'un <i>score</i> per embrions primerencs congelats/ descongelats.....	24
2.2 Implementació de la tècnica de vitrificació en blastocists procedents del programa de DGP	24
2.3 Anàlisi de l'eficiència de la vitrificació en oòcits	24
3. Resultats	26
3.1 Article I: Correlation between embryological factors and pregnancy rate: development of an embryo <i>score</i> in a cryopreservation programme	27
3.2 Article II: Birth after transfer of frozen-thawed vitrified biopsied blastocysts.....	36
3.3 Article III: Vitrified blastocysts from Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) as a source for human Embryonic Stem Cell (hESC) derivation.....	40

3.4 Article IV: How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes	49
4. Discussió	56
4.1 Desenvolupament <i>score</i> embrionari en cicles de criotransferència	57
4.2 Criopreservació embrions en el programa de DGP.....	58
4.3 Anàlisi de l'eficiència de la vitrificació d'òcits	61
4.3.1 <i>Eficiència de la vitrificació en òcits</i>	61
4.3.2 <i>Sistema obert/tancat. Risc de contaminació</i>	63
4.3.3 <i>Indicacions</i>	65
5. Conclusions	68
6. Bibliografia	70

Lista d'abreviatures

- TRA: tècniques de reproducció assistida
- EG: etilenglicol
- PROH: propanodiol
- DMSO: dimetilsulfòxid
- PVP: polivinilpirrolidona
- NL_2 : nitrògen líquid
- ZP: zona pel lúcida
- ICSI: *intracytoplasmic sperm injection*
- SHO: síndrome d'hiperestimulació ovàrica
- FIV: fecundació *in vitro*
- DGP: diagnòstic genètic preimplantacional

1. Introducció

La Criobiologia és la branca de la biologia que estudia l'efecte de les baixes temperatures en les cèl·lules vives i teixits. La criopreservació té com a objectiu preservar la funcionalitat de les cèl·lules mitjançant la reducció de la temperatura per sota del punt on les reaccions químiques poden tenir lloc amb l'objectiu de mantenir la seva viabilitat durant llargs períodes de temps. La supervivència i viabilitat cel·lular després del retorn a la normotèrmia dependran de nombrosos factors tant intrínsecs com extrínsecs que s'interrelacionen entre si.

La criopreservació ha esdevingut una eina indispensable en les Tècniques de Reproducció Assistida (TRA) des que es va obtenir el primer embaràs i naixement a partir d'embrions humans congelats (Trounson and Mohr, 1983; Zeilmaker et al., 1984). Ràpidament es va estendre la tècnica arreu del món ampliant la seva aplicació a diferents estadis embrionaris i també a oòcits assolint en la actualitat més d'un 25% del total de cicles de TRA (Nyboe Andersen et al., 2009).

1.1. Antecedents històrics

La criobiologia i les TRA han evolucionat en gran mesura de forma paral·lela durant els últims 60 anys. La criopreservació d'embrions humans és un procediment que es realitza amb èxit i de forma rutinària ara fa més de 20 anys.

Alguns conceptes bàsics de la criopreservació ja es van establir a finals del segle XIX i principis del XX durant els quals es van estudiar els efectes de les baixes temperatures en plantes. Hans Molisch a la dècada de 1890 va estudiar l'efecte de la congelació en plantes amb ajuda d'un microscopi. Va arribar a concloure, com reflecteix una traducció recent del seu treball, que la composició i concentració de substàncies presents en el citoplasma cel·lular de les plantes determinava la supervivència/mort cel·lular després de la congelació i descongelació (Stout, 1982). En aquest sentit, la importància dels sucres en el procés de congelació/descongelació va sortir a la llum a principis del segle XX (Maximov, 1912). Durant els següents anys es va seguir estudiant el seu efecte en plantes i insectes, però van passar gairebé 50 anys fins que es va plantejar la possibilitat d'afegir alguna substància com a crioprotector per tal d'evitar el dany cel·lular. Va ser l'any 1949 quan es va aconseguir criopreservar amb èxit esperma d'au mitjançant la introducció de glicerol (Polge *et al.*, 1949). Pocs anys més tard es va demostrar com l'esperma de bou criopreservat a -79°C era

capaç de fecundar amb èxit oòcits mitjançant la inseminació artificial (Polge, 1952). Un any després es van reportar els primers embarassos en humans a partir d'esperma congelat (Bunge and Sherman, 1953).

Aquests fets van suposar un gran impuls per a la comprensió dels efectes biològics durant la criopreservació i van donar lloc a una sèrie d'importants estudis en els anys posteriors. Així, es va aprofundir en els danys cel·lulars causats per la formació de gel intra i extracel·lular, la citotoxicitat dels diferents crioprotectors i els canvis cel·lulars induïts pels canvis osmòtics. No va ser fins al 1965, quan la *Society for Cryobiology* va introduir per primer cop el terme “crioprotector”.

En embrions, els primers èxits van arribar al 1972 quan es van obtenir els primers naixements a partir d'embrions de ratolí congelats (Whittingham *et al.*, 1972) però van haver de passar més de 10 anys fins que es van reportar els primers embarassos en humans, a partir d'embrions congelats (Trounson and Mohr, 1983; Zeilmaker *et al.*, 1984). Des d'aleshores la progressió de la tècnica de criopreservació arreu del món ha estat exponencial gràcies a la seva optimització i simplificació (Lassalle *et al.*, 1985).

Gairebé al mateix temps, a l'any 1986, es va obtenir el primer embaràs amb oòcits humans congelats (Chen, 1986) però, tot i la fita aconseguida, van haver de passar molts anys fins que s'establís un protocol prou reproducible i fiable. Durant aquest temps, i malgrat resultats no del tot satisfactoris, la criopreservació d'oòcits ha estat una tècnica molt utilitzada principalment per grups italians a causa de les restriccions legislatives (Porcu *et al.*, 1997).

Totes aquestes fites van ser assolides gràcies a la tècnica de congelació lenta. Paral·lelament, i per tal d'evitar la formació de gel i simplificar el procés es va reactivar l'interès per la tècnica de criopreservació coneguda com a vitrificació, que ja va ser descrita a finals del segle XIX (Tammann, 1898). Va ser el fundador de la criobiologia Basile J. Luyet, qui va descriure la possibilitat d'assolir un estat lliure de cristalls de gel amb efecte negatiu durant la congelació i descongelació, mitjançant la formació d'un sòlid amorf (vidre) (Luyet, 1937). La primera vitrificació en la que es va confirmar l'absència total de cristalls de gel va ser en la reproducció d'un experiment de Luyet l'any 1968 en eritròcits (Nei, 1976).

Un esdeveniment important en la història de la vitrificació va tenir lloc a finals dels anys 70 amb l'entrada en escena de Pierre Boutron que va ser capaç d'entendre el fenomen de la vitrificació i el paper dels crioprotectors (Boutron and Kaufmann, 1978). Gràcies als seus treballs, es va establir la relació existent entre la concentració de crioprotectors i les taxes de

refredament, posant de manifest el problema de la citotoxicitat quan s'utilitzen altes concentracions de crioprotector.

Va ser Gregory M. Fahy qui, amb una sèrie de modificacions importants en les solucions de vitrificació, va fer possible que es reactivés l'interès en aquesta tècnica (Fahy *et al.*, 1984) utilitzant diferents crioprotectors que permetien modificar el temps d'exposició. Finalment Fahy i col·laboradors varen vitrificar amb èxit embrions de ratolí escurçant el temps d'exposició a les solucions amb altes concentracions de crioprotector (Rall and Fahy, 1985).

En els anys successius es van anar optimitzant els sistemes de vitrificació però no va ser fins a ben entrat al segle XXI que no es va arribar a obtenir protocols de vitrificació per la seva aplicació clínica rutinària tant en oòcits com en embrions humans.

1.2. Conceptes bàsics de criobiologia

Independentment de la metodologia utilitzada per la congelació, com a conseqüència del refredament, es produeixen una sèrie d'efectes deleteris en els gàmetes i embrions que poden comprometre'n la supervivència i viabilitat ja que durant la criopreservació les cèl·lules s'exposen a un gran estrès mecànic, tèrmic i químic. La integritat i funcionalitat cel·lular es pot veure compromesa tant durant el descens de la temperatura com durant el retorn a la normotèrmia.

1.2.1 Refredament

El procés de criopreservació es realitza en solucions aquoses en presència de diferents soluts. Durant el procés de congelació d'una solució, l'aigua cristal·litza en forma pura formant una xarxa tetraèdrica. Aquest fenomen té lloc quan la solució arriba a temperatures de -5-10°C. L'inici de la formació de gel es dona de forma aleatòria en el medi extracel·lular a partir de determinats punts (nucleació), mentre que els soluts es van concentrant en la part de la solució que roman en estat líquid. Mentre, les cèl·lules responen deshidratant-se per mantenir l'equilibri osmòtic en un ambient que es va tornant cada vegada més hipertònic. Si la velocitat de refredament és molt ràpida, les cèl·lules no tindrien temps de deshidratar-se i podria donar-se la formació de gel intracel·lular. Si per el contrari, la velocitat és massa lenta, l'excessiva deshidratació cel·lular podria produir un col·lapse i

impedir-ne la seva recuperació. Al mateix temps, els canvis en el volum cel·lular poden afectar la integritat dels orgànuls (McWilliams *et al.*, 1995) i la membrana plasmàtica (Hotamisligil *et al.*, 1996), pel que s'han de conèixer els límits de tolerància per evitar una deshidratació o hidratació excessives i predir l'adició i eliminació dels soluts.

En un programa de refredament controlat, el gel que es forma en el medi extracel·lular avança fins que arriba un punt on la fase líquida assoleix un estat altament viscos adquirint el que es coneix com un estat de “quasi gel” (*quasi-glassy state*). A partir d'aquest punt es produeix la saturació dels soluts i la seva conseqüent precipitació. La concentració de soluts a la que pot arribar una solució abans de solidificar-se a una determinada temperatura es conegut com a punt eutèctic de la solució (Grossmann and Santaló, 1991).

1.2.2 Els crioprotectors

Son substàncies utilitzades per modificar el comportament fisicoquímic de les solucions aquoses on es realitza la criopreservació, protegint les cèl·lules en front el dany potencial durant el refredament.

Hi una gran varietat d'éssers vius entre els que trobem alguns insectes, peixos, amfibis i rèptils que produeixen aquestes substàncies en els seus organismes com a protecció en front de condicions ambientals extremes com les baixes temperatures i/o la deshidratació. Els insectes solen utilitzar sucres com a agents crioprotectors i les granotes de l'Àrtic utilitzen glucosa. Cal ressaltar el cas de les salamandres de l'Àrtic que sintetitzen glicerol en el fetge.

Els crioprotectors son molècules hidrosolubles i de baixa toxicitat i el seu efecte és disminuir el punt eutèctic de les solucions. Això suposa assolir una concentració de soluts donada a una temperatura menor fent que la cèl·lula estigui més deshidratada i, per tant, sotmesa a un gradient osmòtic menor. Aquest efecte s'aconsegueix en disminuir la temperatura a la que es produeix la transició de l'aigua de estat líquid a sòlid, tot interactuant amb les molècules d'aigua, i reduint la capacitat de formar ponts d'hidrogen entre elles. També estableixen ponts d'hidrogen amb molècules biològiques desplaçant les molècules d'aigua i impeding que les proteïnes o el DNA perdin la seva estructura terciària, és a dir, la seva estructura fisiològica nativa i per tant mantinguin la seva funcionalitat.

Els crioprotectors es poden classificar en dos grups en funció de si són o no permeables a la membrana plasmàtica.

Permeables:

El crioprotectors permeables, amb baix pes molecular, son capaços de travessar la membrana de les cèl·lules per dues vies: per simple difusió (forma passiva) i a través de canals situats en la bicapa lipídica (forma activa). La primera queda en un segon terme al ser altament depenent de la temperatura i amb baixa permeabilitat per els crioprotectors. El transport actiu es fa a través de canals (aquaporines), proteïnes de membrana plasmàtica que se n'expressen una gran varietat tant en oòcits com en embrions de mamífer (Edashige *et al.*, 2006). La seva permeabilitat és alta i no depèn tant de la temperatura. Les aquaporines son permeables a una gran varietat de crioprotectors, mostrant una expressió de mRNA diferent tant en funció de l'espècie com per els diferents estadis embrionaris com a l'oòcit (Kasai and Edashige, 2007). Es aquest el motiu pel que l'expressió d'aquests canals afecta de manera directa als procediments de criopreservació (Edashige *et al.*, 2003).

La relació superfície/volum de les cèl·lules a criopreservar influeix en gran mesura en l'eficiència de l'intercanvi d'aigua i crioprotector entre la cèl·lula i el medi extracel·lular. Els oòcits en contenir el seu volum en una esfera única, presenten la menor relació superfície/volum per la qual cosa son menys eficients en l'intercanvi que les cèl·lules dels embrions, que contenen el mateix volum en varies esferes de radi més petit i, per tant, amb una major superfície. En el cas dels zigots, malgrat tenir el mateix ratio superfície/volum que els oòcits s'observa un bona eficiència en l'intercanvi ja que es produeixen canvis en la permeabilitat de membrana durant la fecundació i el desenvolupament embrionari posterior (Jackowski *et al.*, 1980). Aquest fet provoca que sigui més probable la formació de cristalls de gel intracel·lular en els oòcits si no s'han exposat el temps suficient a les solucions crioprotectores.

Al 1969 es van descriure 56 soluts amb activitat crioprotectora (Karow, 1969) però la majoria d'ells amb baixa eficiència pel que no s'inclouen actualment en les solucions crioprotectores. En una revisió posterior només es van identificar 5 crioprotectors amb moderada-alta eficiència (Ashwood-Smith, 1987).

Els crioprotectors permeables més utilitzats son els glicols entre els que es troben l'etilenglicol ($C_2H_6O_2$; EG), el propanodiol ($C_3H_8O_2$; PROH) i el glicerol ($C_3H_8O_3$). En els últims anys el dimetilsulfòxid (CH_3SOCH_3 ; DMSO) ha agafat gran protagonisme gràcies a la tècnica de vitrificació i s'utilitza normalment en combinació amb l'EG.

Durant l'exposició de les cèl·lules als crioprotectors es genera un gradient osmòtic que extrau l'aigua de l'espai intracel·lular. Al ser la membrana cel·lular més permeable a l'aigua que al crioprotector, la pèrdua d'aigua és més ràpida que la incorporació dels crioprotectors permeables i això fa que es produeixi el en primer lloc el col·lapse i posteriorment l'expansió cel·lular. Durant aquest procés, una excessiva pèrdua de volum cel·lular pot produir danys irreversibles. Aquest fenomen ha estat molt estudiat en oòcits de ratolí i en humans (Paynter *et al.*, 1999, 2001, 2005; De Santis *et al.*, 2007). Així doncs, el glicerol, per exemple, és un crioprotector que no s'utilitza en la criopreservació d'oòcits o embrions degut a la menor permeabilitat que presenta respecte altres crioprotectors com son el PROH, el DMSO o l'EG. L'exposició a crioprotectors com el glicerol produirien un excés de col·lapse cel·lular per la pèrdua excessiva d'aigua i la lenta entrada de crioprotector (Edashige *et al.*, 2003).

Els agents crioprotectors descrits no es troben de forma natural als organismes i com a compostos químics que són, poden tenir un efecte citotòxic, tant osmòtic com químic, si l'exposició a les cèl·lules no està prou optimitzada. Aquests efectes nocius poden minimitzar-se disminuint el temps d'exposició i/o la temperatura a la que es realitza el procés així com amb la combinació amb agents crioprotectors no permeables com la sacarosa.

No permeables

Les solucions crioprotectors incorporen també macromolècules d'alt pes molecular que actuen com a crioprotectors no permeables. L'any 1955 es va demostrar l'efecte crioprotector de la polivinilpirrolidona (PVP) i del dextrà en la congelació d'eritròcits (Bricka and Bessis, 1955). La incorporació d'aquestes substàncies va suposar una millora en els protocols de congelació sobretot quan més tard, es van utilitzar en combinació amb crioprotectors permeables. En algunes situacions, l'adició d'agents polimèrics permet reduir la concentració dels crioprotectors permeables disminuint així la toxicitat de les solucions crioprotectors. Aquestes substàncies exerceixen el seu efecte crioprotector promovent una ràpida deshidratació cel·lular tot augmentant el gradient osmòtic. Les més comuns son els sucres com la sacarosa o la trehalosa però també s'utilitzen actualment altres macromolècules com la PVP, el ficol i proteïnes d'alt pes molecular com la hialuronidasa.

1.3. Tècniques de criopreservació

Els dos factors principals en què es basen els mètodes de criopreservació són, els crioprotectors i la velocitat de refredament/escalfament de les mostres. En base a aquest darrer paràmetre, les tècniques de criopreservació poden dividir-se en dos grans grups: la congelació lenta i la vitrificació.

Durant molts anys la tècnica de criopreservació més emprada tant en oòcits com en embrions va ser la congelació lenta. Amb la utilització d'aquesta tècnica han nascut milers de nens, principalment a partir de la transferència d'embrions congelats.

1.3.1 Congelació lenta

Es tracta d'un procés de refredament controlat que es realitza mitjançant l'ús d'un congelador programable.

Prèviament al refredament, s'exposen els oòcits o els embrions a una solució hiperosmòtica (>300 mOsm) amb concentracions moderades de crioprotector permeable (1-2 M) en combinació amb un crioprotector no permeable. Les cèl·lules responen al gradient osmòtic deshidratant-se per la pèrdua d'aigua a través de la membrana incorporant al mateix temps el crioprotector. La taxa de deshidratació i incorporació del crioprotector dependrà de les propietats de la membrana, dels crioprotectors i de la temperatura. Just abans d'iniciar el refredament, les cèl·lules han d'arribar a una situació d'equilibri intra i extracel·lular, igualant-se la pressió osmòtica entre el citoplasma i la solució on es troba en suspensió.

Els suports més utilitzats en la congelació lenta són les palletes de 0,5 ml. Originàriament estaven fabricades amb policlorur de vinil (PVC) però al 1998 es varen descartar perquè no es podien esterilitzar adequadament. Actualment es fabriquen amb glicol de tereftalat de polietilè (GTP). El sistema de segellat de les palletes per assegurar la seva estanqueïtat és per calor, evitant així el contacte de la mostra amb el nitrògen líquid (NL₂).

En el protocol més utilitzat, un cop introduïdes les mostres a la cambra del congelador, el programa de refredament inicia el seu descens des de temperatura ambient (20°C) fins que s'assoleix una temperatura de -7°C, en una primera rampa de refredament de 0,3°C/min. A aquesta temperatura, per evitar els efectes negatius del sobrefredament, s'indueix artificialment la nucleació de cristalls de gel realitzant-se el que es coneix com a *ice seeding*.

El sobrefredament es un estat en el que la suspensió cel·lular refredada lentament assoleix temperatures per sota del punt de cristallització però en estat líquid. En el pas de líquid a sòlid es produeix una alliberació d'energia en forma de calor latent de solidificació. Quant major es el sobrefredament major es l'ascens de temperatura subsegüent. El *ice seeding* ajuda a evitar aquestes variacions de temperatura.

El *ice seeding* facilita la formació de gel a l'espai extracel·lular provocant un augment en la concentració de soluts, facilitant d'aquesta manera la deshidratació de les cèl·lules. Així es minimitza la possible formació de gel en el espai intracel·lular. La temperatura òptima per realitzar el *seeding* es va determinar experimentalment tenint en compte la temperatura a la que s'inicia la formació espontània de gel. Es va determinar que la temperatura òptima es troba entre els -5°C i $-7,5^{\circ}\text{C}$. El *seeding* es fa per contacte directe d'un material normalment metàl·lic extremadament fred (per contacte amb NL_2) sobre el suport que conté la mostra.

Després del *seeding* s'inicia una nova rampa de refredament, a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, fins arribar a la temperatura de -30°C .

Un cop s'arriba a la temperatura de -30°C es sotmet a la mostra a un descens molt ràpid de temperatura ($-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$) fins -150°C , moment en el que es submergeixen les mostres en NL_2 ($-195,8^{\circ}\text{C}$).

Durant el procés de descongelació es important tenir en compte la velocitat d'escalfament ($200\text{-}350^{\circ}\text{C}/\text{min}$) per evitar la recristallització. La descongelació es ràpida exposant breument (40 s) les palletes a temperatura ambient i submergint-les després en un bany amb aigua a 30°C (40 s). Després de recuperar els oòcits o embrions del medi on han estat criopreservats, s'ha de procedir a extreure el crioprotector de l'interior de les cèl·lules. Això es fa mitjançant una sèrie de solucions amb concentracions decreixents de crioprotector permeable i sacarosa per promoure l'eliminació i dilució del crioprotector. La utilització de crioprotectors no permeables permet accelerar el procés tot evitant que es produeixi el xoc osmòtic.

1.3.2 Vitrificació

La vitrificació és un procés de solidificació d'una solució, en condicions específiques de refredament i concentració de soluts, al que s'arriba per un augment extrem de la viscositat obtenint un sòlid amorf (no cristal·lí) similar al vidre (*quasi-glassy state*). Contràriament a la

congelació lenta no es produeix l'efecte deleteri per l'alta concentració de soluts i electròlits a la fracció que resta líquida amb la deshidratació extrema que això representa.

La vitrificació presenta dos avantatges principals respecte la congelació lenta: evita totalment la possible formació de gel tant dins com fora de la cèl·lula sent aquest el principal problema de la congelació lenta i, a més, no necessita d'un equip específic com és el congelador programable.

En tot procés de vitrificació s'evita la formació de gel tant en el citoplasma com en la solució extracel·lular mitjançant l'aplicació d'altres taxes de refredament juntament amb la utilització de solucions amb altres concentracions de crioprotector. La Temperatura a la que s'obté l'estat vítri es denomina Temperatura de transició vítria (T_g). Igualment important és la velocitat d'escalfament de les mostres per evitar també en aquest procés la formació de gel.

A diferència de la congelació lenta, la deshidratació de les cèl·lules es produeix just abans de la baixada de temperatura exposant les cèl·lules a altres concentracions de crioprotector (4-8 M), concentracions que poden arribar a ser citotòxiques.

Les solucions utilitzades inicialment en la tècnica de vitrificació d'embrions eren altament citotòxiques (Rall and Fahy, 1985; Ishimori *et al.*, 1993). En aquests primers anys es va reconèixer la influència de la temperatura en la permeabilitat de la membrana als crioprotectors (Kasai *et al.*, 1990). La introducció de crioprotectors no permeables a les solucions i la combinació de diferents crioprotectors va portar a identificar solucions menys tòxiques (Kasai *et al.*, 1990; Ali and Shelton, 1993; Saito *et al.*, 1994; Mukaida *et al.*, 1998; Kuleshova *et al.*, 1999). Aquest fet va permetre disminuir la concentració dels crioprotectors permeables i disminuir també el temps d'exposició a les solucions. La presència de macromolècules no permeables a la membrana de les cèl·lules disminueix la toxicitat de les solucions, podent realitzar el procés a menor temperatura amb la disminució de la toxicitat que això representa.

Els crioprotectors permeables més àmpliament utilitzats en la tècnica de vitrificació són l'EG i el DMSO que habitualment s'utilitzen combinats amb un o dos crioprotectors no permeables. El més utilitzat és la sacarosa tot i que molts protocols n'incorporen d'altres com l'àcid hialurònic o el ficol entre d'altres.

Els primers suports utilitzats en vitrificació van ser les palletes tradicionals de congelació. Amb aquests suports només s'aconseguien taxes de refredament de 2500°C/min. Per

aquest motiu eren necessàries concentracions massa elevades de crioprotector no evitant-se els danys produïts per les baixes temperatures per sobre de la temperatura de congelació (conegut com efecte *chilling*) que es produeixen durant la congelació lenta (Kasai *et al.*, 1996). Aquests danys es coneixen amb el nom de *chilling injury*.

Per tal d'aconseguir un augment de la taxa de refredament es van desenvolupar protocols que minimitzaven el volum on es on es criopreservaven les mostres (Steponkus *et al.*, 1990; Martino *et al.*, 1996; Vajta *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 1999).

S'ha descrit que un increment en la taxa de refredament permet utilitzar solucions amb concentracions més baixes de crioprotector (Vajta and Nagy, 2006). Per altra banda, els suports o contenidors on es du a terme la vitrificació han de tenir una elevada conductivitat tèrmica.

Així, en els últims anys s'han desenvolupat una gran varietat de suports que es poden classificar en sistemes tancats i sistemes oberts, en funció de si la vitrificació es realitza en contacte directe de la mostra amb el NL_2 o sense contacte directe. La utilització de sistemes oberts permet assolir taxes de refredament extremadament elevades però amb l'ànim d'evitar el risc de contaminació per el contacte directe de la mostra en NL_2 s'han desenvolupat també nombrosos sistemes que aïllen la mostra del NL_2 (Vajta and Nagy, 2006).

Entre els sistemes oberts més utilitzats està el sistema *Cryotop*TM que s'ha aplicat amb èxit tant en oòcits com en embrions humans (Kuwayama *et al.*, 2005a, 2005b).

1.4. Criopreservació en Reproducció Assistida

1.4.1 Oòcits

Els primers protocols utilitzats en oòcits no distaven gaire del descrit per Lassalle i col·laboradors al 1985 (Lassalle *et al.*, 1985) i els primers embarassos en humans es van obtenir per la congelació lenta amb DMSO com a crioprotector (Chen, 1986; Al-Hasani *et al.*, 1987; van Uem *et al.*, 1987; Siebzehnruebl *et al.*, 1989). Aquests primers èxits no van tenir continuïtat i es va posar de manifest la major sensibilitat dels oòcits a la criopreservació. Els oòcits son més vulnerables que els embrions al dany causat per les

baixes temperatures (*chilling injury*) i tenen un baix coeficient de conductivitat hidràulica (Lp) o permeabilitat a través de la membrana.

Per altra banda, els oòcits criopreservats mostraven una taxa de fecundació baixa degut a l'enduriment de la zona pel·lúcida (ZP). La introducció l'any 1992 de la tècnica de Microinjecció espermàtica intracitoplasmàtica (*intracytoplasmic sperm injection*; ICSI) (Palermo *et al.*, 1992) va reactivar l'interès en la criopreservació d'oòcits donant així inici a una nova etapa. El primer pas va ser proposar un nou mètode de congelació lenta que incorporava com a crioprotector permeable el PROH en substitució del DMSO (Gook *et al.*, 1993, 1994, 1995). L'aplicació clínica del nou protocol es va estendre a molts grups, especialment a grups italians que tenien lleis de reproducció molt restrictives envers la criopreservació d'embrions (Porcu *et al.*, 1997).

Algunes de les modificacions que es van du a terme basant-se en estudis sobre la permeabilitat de la membrana (Paynter *et al.*, 2005) van portar a disminuir la concentració de sacarosa de les solucions de congelació, mantenint les altes concentracions en la descongelació (Bianchi *et al.*, 2012).

Resultats insuficients en quant a la taxa de supervivència i embaràs en congelació lenta d'oòcits va portar a la optimització de la tècnica de vitrificació.

La publicació l'any 2005 d'un protocol de vitrificació que utilitza EG i DMSO com a crioprotectors permeables va suposar un punt d'inflexió a partir del qual s'obtenen taxes de supervivència al voltant del 90% i taxes d'embaràs comparables a les dels oòcits en fresc (Yoon *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001; Kuwayama *et al.*, 2005a). Aquests resultats van ser reproduït amb èxit per altres grups (Antinori *et al.*, 2007; Cobo *et al.*, 2008; Almodin *et al.*, 2010a; Rienzi *et al.*, 2010; Trokoudes *et al.*, 2011).

La criopreservació d'oòcits té les següents aplicacions en TRA:

- Permet simplificar en gran mesura els programes de donació d'oòcits amb la creació de bancs tot simplificant també les tasques de selecció de la donant i la receptora, evitant la seva sincronització.
- Pot tenir una gran importància en pacients infèrtils que per motius morals o religiosos tenen objeccions a criopreservar embrions. En aquests casos es podria inseminar un nombre limitat d'oòcits, criopreservant la resta.

- També és de gran utilitat en aquells casos en els que no és possible obtenir la mostra d'esperma el dia de la punció fol·licular.
- Alguns grups ha proposat també la seva utilització en casos en els que, per diferents motius, no s'aconsella la transferència embrionària en el mateix cicle estimulat. Per exemple, pacients amb risc de desenvolupar un síndrome d'hiperestimulació ovàrica (SHO) o pacients amb endometris poc receptives (transferència diferida).
- Permet la possibilitat de preservar la fertilitat en pacients que per raons mèdiques poden perdre o veure disminuïda la seva capacitat reproductiva.
- Per últim, dona la possibilitat de planificar la maternitat posposant-la fins al moment desitjat.

1.4.2 Embrions primerencs

Tot i que els primers embarassos amb embrions humans congelats van ser reportats amb DMSO com a crioprotector (Trounson and Mohr, 1983), els 25 anys següents la majoria de protocols incorporaven el PROH i sacarosa com a crioprotectors (Lassalle *et al.*, 1985). Aquest protocol proposat per Lassalle i col·laboradors es avui en dia molt utilitzat amb només lleugeres modificacions.

Les primers experiències publicades amb la vitrificació d'embrions primerencs no semblaven indicar que la tècnica pogués substituir la congelació lenta (Mukaida *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 1999; El-Danasouri and Selman, 2001), però amb la incorporació de nous suports per la vitrificació es van millorar els resultats augmentant significativament les taxes de supervivència i embaràs i reactivant així l'interès de la vitrificació en embrions primerencs (Kuwayama *et al.*, 2005b; Rama Raju *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2007).

La criopreservació d'embrions té les següents aplicacions en TRA:

- Permet preservar els embrions supernumeraris que no es transfereixen en el cicle de fecundació *in vitro* (FIV) en fresc, augmentant així l'eficiència del cicle de tractament a través de les transferències successives amb els embrions criopreservats. El conjunt de transferències embrionàries derivades d'un cicle de FIV es coneix amb el nom de taxa d'embaràs acumulat.

- En els casos en els que es vol evitar fer la transferència per prevenir el risc de SHO o per un endometri poc receptiu, la criopreservació d'embrions es una alternativa a la criopreservació d'oòcits.

1.4.3 Blastocists

La criopreservació de blastocists requereix especial atenció degut a les seves especificitats morfològiques. Conté a la seva estructura la cavitat blastocèlica que és plena líquid facilitant la formació de gel al seu interior.

El primer embaràs amb blastocists congelats es va aconseguir amb la tècnica de congelació lenta amb glicerol com a crioprotector (Cohen *et al.*, 1985). Pocs anys després i amb l'augment de l'interès pel cultiu llarg fins a blastocist es van reportar les primeres sèries amb blastocists congelats/descongelats però amb baixes taxes de supervivència (50-60%) i embaràs (15%) (Hartshorne *et al.*, 1991; Ménézo *et al.*, 1992). El grup de Y. Menezo va realitzar una sèrie de modificacions afegint sacarosa com a crioprotector no permeable fent que s'establís com el protocol més utilitzat en blastocists (Kaufman *et al.*, 1995). La immensa majoria de protocols de congelació lenta incorporen glicerol com a crioprotector permeable, a diferència del PROH utilitzat generalment en la congelació d'embrions primerencs.

El primer embaràs amb vitrificació de blastocists es va aconseguir utilitzant EG i DMSO com a crioprotectors i amb l'ús d'una palleta clàssica de congelació (Yokota *et al.*, 2000).

Alguns grups van centrar els seus esforços en aconseguir millorar les taxes de supervivència dels blastocists expandits realitzant el col·lapse artificial per tal de minimitzar l'efecte de la formació de gel en la cavitat blastocèlica (Zech *et al.*, 2005; Mukaida *et al.*, 2006; Rama Raju *et al.*, 2009).

Amb optimització de les taxes de refredament/escalfament de les mostres mitjançant la introducció de nous suports es va estendre ràpidament la vitrificació demostrant una superioritat en la taxa de supervivència quan es comparava amb la congelació lenta (Kuwayama *et al.*, 2005b; Stehlik *et al.*, 2005; Loutradi *et al.*, 2008).

Els blastocists procedents de cicles de diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) han mostrat sempre una major sensibilitat al procés de criopreservació comparats amb els blastocists provinents d'embrions que no han estat biopsiats. Aquesta sensibilitat especial

es probablement deguda a què la ZP ha estat foradada per poder realitzar la biòpsia. Les primeres experiències reportades en congelació lenta mostraven resultats molt inferiors als obtinguts amb embrions que no havien estat manipulats prèviament (Joris *et al.*, 1999; Magli *et al.*, 1999, 2006) però amb la introducció de la vitrificació es van començar a rendibilitzar els blastocists supernumeraris dels cicles de DGP per la qual cosa va contribuir el treball que forma part d'aquesta tesis doctoral (vegeu article II: Birth after transfer of frozen-thawed vitrified biopsied blastocysts).

La criopreservació de blastocists, a més de les aplicacions esmentades anteriorment per embrions primerencs, té una aplicació clau en els cicles de DGP.

En la majoria de centres de reproducció assistida on es realitzen cicles de DGP es necessari criopreservar els embrions en estadi de blastocist ja sigui per el temps necessari que implica el diagnòstic genètic o per que es realitza la biòpsia en estadi de blastocist.

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball es optimitzar els programes de criopreservació tant d'embrions primerencs com de blastocists així com validar la introducció de la tècnica de vitrificació en la criopreservació d'oòcits.

Aquest objectiu s'ha dividit en tres objectius parcials:

2.1. Desenvolupament d'un *score* per embrions primerencs congelats i descongelats

Per tal d'optimitzar els resultats en el programa de criotransferència embrionària en embrions congelats/descongelats en D+2/+3 es va proposar d'analitzar els paràmetres embrionaris indicatius del seu potencial d'implantació. A partir d'aquests paràmetres es va plantejar desenvolupar un *score* per quantificar el potencial d'implantació dels embrions un cop descongelats i posats en cultiu *overnight* per facilitar-ne l'elecció en el moment de la transferència.

2.2. Implementació de la tècnica de vitrificació en blastocists procedents del programa de DGP

Els resultats insuficients obtinguts amb la congelació lenta de blastocists en els programes de DGP van esperonar molts grups a introduir la tècnica de vitrificació als seus laboratoris, a partir de l'experiència obtinguda amb la vitrificació desenvolupada en blastocists no sotmesos a una biòpsia prèvia.

Inicialment, la vitrificació es va dur a terme amb medis i suports elaborats al laboratori. Malgrat la millora en els resultats obtinguts en el programa de DGP, i donat el constant desenvolupament de nous sistemes de vitrificació comercials es va voler comparar l'eficàcia dels nous materials i medis comercials amb l'emprat fins al moment. Per fer-ho, es va avaluar la supervivència dels blastocists vitrificats i desvitrificats procedents del programa de DGP així com l'eficiència en la derivació de cèl·lules mare embrionàries.

2.3. Anàlisi de l'eficiència de la vitrificació en oòcits

La tècnica de vitrificació en oòcits ha demostrat en els últims anys un efecte deleteri mínim sobre la seva viabilitat mostrant una elevada eficiència. Per aquesta raó es va plantejar comparar els resultats obtinguts utilitzant oòcits de donant procedents de la mateixa cohort en receptores que rebien els oòcits en fresc o vitrificats. Es van avaluar els indicadors mes

habituals en viabilitat oocitària a fi de determinar l'efecte de la vitrificació en l'eficiència dels cicles de donació d'oòcits i així poder plantejar les estratègies mes eficaces encaminades a augmentar les taxes de naixement en cicles que incloguin la criopreservació d'oòcits.

3. Resultats

3.1. Article I: Objectiu 1

Títol: Correlation between embryological factors and pregnancy rate: development of an embryo *score* in a cryopreservation programme.

Autors: Miquel Solé, Josep Santaló, Ignacio Rodríguez, Montserrat Boada, Buenaventura Coroleu, Pere N. Barri, Anna Veiga.

Revista: Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2011), 28: 129-136.

Índex d'impacte: 1.823 (2012).

3.2. Article II: Objectiu 2

Títol: Birth after transfer of frozen-thawed vitrified biopsied blastocysts.

Autors: Mónica Parriego, Miquel Solé, Ramon Aurell, Pere N. Barri, Anna Veiga.

Revista: Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2007), 24: 147-149.

Índex d'impacte: 1.823 (2012).

3.3. Article III: Objectiu 2

Títol: Vitrified blastocysts from Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) as a source for human Embryonic Stem Cell (hESC) derivation.

Autors: Begoña Aran, Miquel Solé, Ignasi Rodríguez-Pizà, Mónica Parriego, Yolanda Muñoz, Montserrat Boada, Pere N. Barri, Juan Carlos Izpisúa, Anna Veiga.

Revista: Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2012), 29: 1013-1020.

Índex d'impacte: 1.823 (2012).

3.4. Article IV: Objectiu 3

Títol: How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes.

Autors: Miquel Solé, Josep Santaló, Montserrat Boada, Eli Clua, Ignacio Rodríguez, Buenaventura Coroleu, Pere N. Barri, Anna Veiga.

Revista: Human Reproduction (2013), 28: 2087-2092.

Índex d'impacte: 4.67 (2012).

4. Discussió

4.1. Desenvolupament *score* embrionari en cicles de criotransferència

Per poder desenvolupar el *score* presentat es van identificar les variables embriològiques que afectaven significativament el potencial d'implantació analitzant els resultats de la transferència única d'embrions congelats i descongelats. Es va establir una correlació directa entre la taxa d'implantació i els següents paràmetres: el nombre de cèl·lules i la seva simetria abans de la congelació, la supervivència després de la descongelació i la reactivació de la divisió després del cultiu *overnight*.

El *score* proposat es una eina útil per embrions sotmesos a la tècnica de congelació lenta sent capaç de predir el seu potencial implantatori (vegeu article I: Correlation between embryological factors and pregnancy rate: development of an embryo *score* in a cryopreservation programme).

A més, aquest *score* ha estat de gran utilitat per tal de poder determinar quin es l'embrió amb un major potencial d'implantació. L'embrió de màxima qualitat (*score* 10) seria aquell que en dia +3 de cultiu presenta entre 6 i 9 cèl·lules de mida similar, amb una supervivència després de la descongelació $\geq 80\%$ i que després del cultiu *overnight* s'observava la divisió d'almenys dues cèl·lules.

El valor de *score* obtingut es transforma en un valor entre 0 i 10 per tal de facilitar la valoració dels embrions descongelats. Es van categoritzar en funció del *score* en quatre grups: ≤ 2.5 , 2.51-5, 5.01-7.5 i > 7.5 . La taxa d'implantació per grup va ser de 0%, 6.1%, 23.9% i 47.8% respectivament. Cap embrió del primer grup va implantar, un 6.1% dels embrions del segon grup van implanta, valorar les possibilitats d'implantació de l'embrió.

La utilització del *score* ens permet la possibilitat de descongelar més embrions posposant la transferència al dia següent si la probabilitat d'implantació calculada per el *score* dels embrions a transferir es baixa. Aquesta estratègia ens podria permetre optimitzar els resultats en els cicles de criotransferència d'embrions congelats i descongelats.

En els últims anys, s'ha experimentat un canvi constant dels protocols de la congelació lenta cap a la vitrificació per part dels laboratoris de FIV. Aquest fet ve donat pel fet que nombrosos estudis han demostrat unes taxes de supervivència embrionària i un major nombre d'embrions intactes després de la vitrificació en front la congelació lenta (Kuwayama *et al.*, 2005b; Rama Raju *et al.*, 2005; Balaban *et al.*, 2008; Rezazadeh Valojerdi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). En quant al desenvolupament posterior a la desvitrificació en embrions de dia 3, s'ha obtingut també una taxa de blastocist significativament superior

amb embrions vitrificació que amb la congelació lenta (Balaban *et al.*, 2008). Recentment, s'ha demostrat també com els embrions en dia 3 vitrificats tenen un millor desenvolupament després del cultiu *overnight* independentment del nombre de cèl·lules lisades i del nombre de cèl·lules abans de la vitrificació (Van Landuyt *et al.*, 2013).

Les grans diferències existents en la supervivència embrionària i el seu comportament després del cultiu *overnight* fa que el *score* desenvolupat perdi aplicabilitat en els laboratoris.

Tot i que l'ús de la congelació lenta esta sent cada cop mes limitat, s'ha de tenir en compte, que la immensa majoria dels embrions que romanen criopreservats en els centres de TRA són embrions que han estat criopreservats encara amb aquesta tècnica. Per aquesta raó, el *score* desenvolupat adquireix rellevància en les descongelacions d'embrions criopreservats anteriorment a la incorporació de la vitrificació. Aquests embrions són igualment valuosos ja que estan pendents de ser transferits a les pròpies parelles, de ser donats a altres parelles o bé, ésser donats a projectes de recerca.

4.2. Criopreservació embrions en el programa de DGP

Els programes de DGP estan adquirint cada cop més protagonisme en els centres de reproducció assistida, gràcies en part, a la millora dels mètodes de diagnòstic amb la recent incorporació de noves tècniques que permeten estudiar tots els cromosomes. Això ha suposat un increment significatiu en les taxes d'embaràs evolutiu fent aconsellable en tots els casos la transferència d'un sol embrió per evitar l'embaràs múltiple (Forman *et al.*, 2013).

S'han reportat baixes taxes de supervivència i embaràs en criopreservació d'embrions biopsiats tant en estadis primerencs com en estadi de blastocist mitjançant la tècnica de congelació lenta (Joris *et al.*, 1999; Magli *et al.*, 1999, 2006).

Aquest fet, juntament amb els bons resultats obtinguts amb la vitrificació de blastocists no manipulats (Kuwayama *et al.*, 2005b; Takahashi *et al.*, 2005; Liebermann and Tucker, 2006), va portar a incorporar la vitrificació en els programes de DGP a molts centres de TRA. Es van publicar les primeres experiències amb resultats prometedors pel que fa a la vitrificació de blastocists prèviament biopsiats (Wu *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005) però no va ser fins al 2007 que no es va publicar cap naixement amb la vitrificació de blastocists provinent d'un cicle de DGP (vegeu article II: Birth after transfer of frozen-thawed vitrified biopsied blastocysts). A partir d'aquest primer cas que va posar de manifest la possibilitat d'aplicar la vitrificació com una tècnica simple, segura i de baix cost en blastocists obtinguts a partir

d'embrions biopsiats en dia 3, la relació entre el DGP i la vitrificació ha experimentat grans canvis en els darrers anys.

Aquest primer èxit va ser assolit amb medis de vitrificació i suports *home-made*, però l'extraordinari desenvolupament comercial dels procediments de vitrificació va aconsellar un canvi d'estratègia. La utilització de sistemes de vitrificació *home-made* i posteriorment de medis comercials va permetre l'anàlisi dels resultats obtinguts amb els dos sistemes a fi d'esbrinar quin dels dos mètodes donava millor resultat pel que fa a la supervivència (vegeu article III: Vitri-fied blastocysts from Preimplantation Genetic Diagnosis as a source for human Embryonic Stem Cell derivation). La taxa de supervivència obtinguda amb el sistema de vitrificació comercial va doblar la del mètode *home-made* (91.5% i 44.7% respectivament). Altres publicacions, aparegudes amb posterioritat, també presenten taxes de supervivència >90% amb la vitrificació de blastocists prèviament biopsiats deixant enrere una època en el que no s'aconseguia superar el 50% de manera consistent (Zhang *et al.*, 2009; Van Landuyt *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2013b).

En els últims anys s'han publicat també diferents experiències amb la congelació lenta d'embrions biopsiats demostrant que es una tècnica que pot aplicar-se amb èxit en els programes de DGP (El-Toukhy *et al.*, 2009). Malgrat tot, en un estudi comparatiu entre congelació lenta i vitrificació (Keskintepe *et al.*, 2009), s'obtenen diferències significatives en favor de la vitrificació en tots els paràmetres analitzats.

En un programa de DGP en què es realitza la biòpsia en dia 3 i es mantenen els embrions en cultiu fins a blastocist, la vitrificació es la millor estratègia per tal de criopreservar els blastocists supernumeraris diagnosticats com a normals per tal d'augmentar la taxa d'embaràs acumulat.

D'altra banda, una estratègia que s'està estenent arreu del món en els programes de DGP, es la realització de la biòpsia embrionària en estadi de blastocist. El més habitual es realitzar un forat a la ZP en dia 3 de desenvolupament i realitzar la biòpsia quan el blastocist inicia l'eclosió, moment en el qual es pot extreure un grup de cèl·lules del trofocoderm. Ara ja fa més de 15 anys, la biòpsia de cèl·lules del trofocoderm en estadi de blastocist va ser descrita com una de les potencials aplicacions de la tècnica de làser en el laboratori de FIV (Veiga *et al.*, 1997). Els primers embarassos de DGP utilitzant la biòpsia de blastocists no van arribar fins uns anys mes tard, demostrant que es tracta d'una estratègia amb certs

avantatges en front la biòpsia en dia 3 (de Boer *et al.*, 2004; McArthur *et al.*, 2005; Kokkali *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2013):

- La biòpsia permet extreure un major nombre de cèl·lules incrementant la probabilitat d'obtenir el diagnòstic i millorant la seva fiabilitat.
- A més, aquestes cèl·lules representen en la majoria de casos, una fracció menor del total de cèl·lules de l'embrió afectant en menor mesura a la seva viabilitat.
- Redueix els costos i la càrrega de treball. La biòpsia i anàlisis es realitza en un nombre menor d'embrions.

Per contra, està en dubte, si les cèl·lules del trofotoderm representen la constitució genètica de l'embrió i la importància del possible paper del mosaïcisme en aquest tipus cel·lular (Fragouli *et al.*, 2008).

En els últims anys, avenços en biologia molecular permeten estudiar de forma exhaustiva la constitució genètica completa incloent tots els cromosomes de les cèl·lules analitzades (*Comprehensive Chromosome Screening*, CCS). Aquestes tècniques inclouen la hibridació genòmica comparada (CGH) (Wilton *et al.*, 2003; Schoolcraft *et al.*, 2010), que es va ampliar posteriorment a l'array-CGH (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2011), a la tecnologia SNP-array (Schoolcraft *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2012), a la PCR quantitativa en temps real (qPCR) (Treff *et al.*, 2012) i, a la més recent, NSG (*Next-generation sequencing*) (Martín *et al.*, 2013).

La criopreservació es un component essencial en els cicles de DGP amb CCS en blastocists, especialment si preferim realitzar la transferència en dia 5 o no es disposa d'un laboratori amb la capacitat d'obtenir els resultats amb la rapidesa necessària. La biòpsia de trofotoderm amb CCS necessita almenys de 24 hores per obtenir el resultat la qual cosa fa que la transferència embrionària s'hauria de dur a terme en dia 6 (Yang *et al.*, 2012; Forman *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2013). De tota manera s'han reportat resultats excel·lents amb la vitrificació dels blastocists analitzats i la transferència diferida en un cicle artificial o natural posterior, tractant-se per tant de l'estratègia d'elecció més àmpliament utilitzada (Zhang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Schoolcraft *et al.*, 2011; Lathi *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013b; Schoolcraft and Katz-Jaffe, 2013).

D'altre banda, en casos en que no s'obté diagnòstic en embrions biopsiats en dia 3, es possible realitzar una segona biòpsia a l'estadi de blastocist i vitrificar-los a l'espera del

diagnòstic, per ser definitivament descartats o preservats per futurs intents (Wininger *et al.*, 2011).

S'ha descrit recentment la doble vitrificació de blastocists en cicles de DGP amb la publicació d'un naixement (Peng *et al.*, 2011). Tot i ser un procediment que s'ha d'intentar evitar, la estratègia sembla no comprometre els resultats (Taylor *et al.*, 2014).

4.3. Anàlisi de l'eficiència de la vitrificació d'oòcits

Per poder avaluar l'impacte de la vitrificació minimitzant factors extrínsecs a la pròpia tècnica, es van analitzar totes les donacions d'oòcits que disposaven d'un nombre suficient d'oòcits per poder donar una part dels oòcits en fresc i una altre vitrificats. No es van observar diferències significatives entre els dos grups en cap dels paràmetres estudiats: la taxa de fecundació (80.7 i 78.2%), la taxa d'embrions evolutius (71.0% i 68.2%) ni en la taxa d'embrions òptims (54.1 i 49.8%). També va ser similar la taxa de nen nascut viu a casa per transferència que vas ser del 38.4% en el grup de receptores d'oòcits en fresc i de 43.4% en el d'oòcits vitrificats. Els resultats obtinguts demostren com la tècnica emprada en aquest estudi per la vitrificació d'oòcits no afecta ni a la funcionalitat dels oòcits ni en la seva capacitat de produir embrions evolutius, embaràs i nen nascut a casa (vegeu article IV: How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes).

4.3.1 Eficiència de la vitrificació en oòcits

La vitrificació s'ha imposat clarament arreu del món com a tècnica preferent en el cas dels oòcits per la seva superioritat en front la congelació lenta. Aquesta superioritat queda palesa no només en la supervivència després de la desvitrificació si no que també existeixen diferències en quant a la qualitat dels embrions obtinguts (Edgar and Gook, 2012). Es, a més, la tècnica recomanada per diferents societats científiques (Alpha Scientists In Reproductive Medicine, 2012; ESHRE Task Force on Ethics and Law *et al.*, 2012).

De tota manera, no cessen els esforços en la millora de la tècnica de congelació lenta per a oòcits i es comencen a veure els primers resultats equiparables als obtinguts amb la vitrificació. Així, la introducció d'una sèrie de modificacions en el protocol de descongelació ha portat a millorar les taxes de supervivència fins el punt d'equiparar-les a les obtingudes amb la tècnica de vitrificació. També s'ha demostrat la seva capacitat de desenvolupament avaluant l'activació partenogenètica del oòcits descongelats (Parmegiani *et al.*, 2014).

Tot i així, com es demostra en el treball presentat en la tesis (vegeu article IV: How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes) i en altres publicacions anteriors (Cobo *et al.*, 2010a; Trokoudes *et al.*, 2011), els resultats obtinguts amb oòcits vitrificats i oòcits en fresc no difereixen. La vitrificació d'oòcits de donant sembla que no té cap efecte sobre la taxa de fecundació, la qualitat embrionària, la taxa d'embaràs ni la taxa de nen nascut viu a casa.

De tota manera, existeix poca evidència de com afecta a la vitrificació a la qualitat oocitària en pacients infèrtils, especialment en pacients d'edat avançada. En un estudi en el que es va randomitzar els oòcits obtinguts de 40 pacients de FIV, no es van observar diferències en la qualitat dels embrions obtinguts amb oòcits en fresc i oòcits vitrificats (Rienzi *et al.*, 2010). També s'ha reportat una qualitat embrionària similar en un estudi portat a terme en pacients amb baixa resposta que havien realitzat almenys un cicle previ per acumular oòcits (Cobo *et al.*, 2012b).

En un altre estudi portat a terme en pacients de entre 30 i 39 anys no obtenen diferències tampoc en la qualitat dels embrions obtinguts d'oòcits vitrificats quan es comparen amb els obtinguts d'oòcits en fresc. S'ha de tenir en compte però el baix nombre de casos inclosos en l'estudi (11 per grup) i l'exclusió de les pacients amb una resposta menor a 8 oòcits madurs (Chang *et al.*, 2013a).

Per contra, en un altre estudi en el que també es van comparar els resultats dels oòcits en fresc amb oòcits vitrificats sí que van obtenir embrions amb un menor nombre de cèl·lules en dia 3 en el grup d'embrions derivats d'oòcits vitrificats (Almodin *et al.*, 2010b). En aquesta línia, en un estudi portat a terme en pacients de DGP, es van comparar els resultats amb oòcits en fresc i oòcits vitrificats per l'acumulació d'oòcits obtenint finalment una taxa d'embrions biopsiables significativament inferior en el grup d'oòcits vitrificats (Forman *et al.*, 2012).

Recentment, amb l'ànim de determinar de forma més acurada l'eficiència de la vitrificació d'oòcits en pacients infèrtils, es van comparar els resultats però fent l'anàlisi per oòcit assignat. Tot i no obtenir diferències en la taxa de nen nascut, sí que van obtenir una taxa de blastocists significativament inferior en el grup d'oòcits vitrificats (Goldman *et al.*, 2013).

En una metanàlisi publicada recentment, on es comparen els resultats d'estudis en vitrificació d'oòcits de donant i de pacients de FIV, queda demostrada la millor taxa de

supervivència, fecundació, divisió i embaràs amb oòcits procedents de donants. Això pot ser degut a una millor qualitat oocitària en les dónes joves donants d'oòcits en front la qualitat oocitària de les pacients amb problemes de fertilitat que, a més, son habitualment de més edat (Potdar *et al.*, 2014). Els oòcits de pitjor qualitat poden tenir una menor resistència a la vitrificació. En aquests sentit, dades de dos estudis del mateix grup apunten també a una millor supervivència a la vitrificació dels oòcits obtinguts de donants (Cobo *et al.*, 2008) en front de la de pacients infèrtils(Cobo *et al.*, 2012c). Semblaria doncs, que els oòcits de pitjor qualitat podrien tenir una menor resistència a la vitrificació.

4.3.2 Sistema obert/tancat. Risc de contaminació

El sistema de vitrificació més emprat per la seva gran eficiència contrastada es el sistema conegut com a *Cryotop*TM (Kuwayama *et al.*, 2005a), com així ho mostra l'última revisió publicada en vitrificació d'oòcits on 14 dels 21 estudis inclosos utilitzen aquest sistema (Potdar *et al.*, 2014). Aquest suport permet arribar a unes taxes de refredament i escalfament de 23.000 °C/min i 42.000 °C/min respectivament.

Una de les limitacions, d'aquest sistema i d'altres similars, que més freqüentment s'ha apuntat es que permeten el contacte directe amb el NL_2 exposant les mostres a un risc potencial de contaminació amb patògens (Bielanski *et al.*, 2003; Balaban *et al.*, 2007). S'ha de tenir en compte, però, que mai s'ha documentat una contaminació entre mostres criopreservades en TRA. A més, s'ha publicat recentment un estudi en el què s'utilitzaven mostres deliberadament infectades on es demostra el risc pràcticament nul de transmissió vírica entre elles (Cobo *et al.*, 2012a).

Malgrat tot, per tal de superar les suspicàcies que aixequen els sistemes oberts en aquest sentit, continuen els esforços per desenvolupar sistemes tancats que ofereixin la mateixa eficiència que els sistemes oberts.

Els sistemes tancats tenen la limitació de que no sobrepassen els 2000 °C/min però presenten l'avantatge que permeten aïllar la mostra del NL_2 . A més, es ben conegut que per una concentració de crioprotectors donada la taxa de escalfament es molt més crítica que la taxa de refredament en si mateixa (Fahy *et al.*, 1987; Seki and Mazur, 2009). D'aquesta manera, els sistemes que aïllen la mostra del NL_2 necessiten concentracions intracel·lulars de crioprotector més elevades per evitar la formació de gel.

Tot i això, la vitrificació amb sistema tancat també ha demostrat la seva eficàcia. En un estudi portat a terme amb un sistema tancat i en pacients infèrtils, no es van obtenir

diferències significatives en la taxa de fecundació ni de blastocist quan es comparaven amb els resultats obtinguts en el mateix període amb oòcits en fresc (Grifo and Noyes, 2010).

En un altre estudi dut a terme també amb un sistema tancat de vitrificació en un programa de donació d'oòcits, es descriu una taxa d'implantació per oòcit desvitrificat del 10%, una taxa de supervivència superior al 90% i un 60% dels embrions obtinguts de bona qualitat (Stoop *et al.*, 2012).

Amb l'objectiu de determinar si els sistemes tancats ofereixen la mateixa eficiència que els sistemes oberts, es va dur a terme un estudi prospectiu randomitzat en el que es comparaven les dues tècniques en la mateixa cohort d'oòcits del programa de donació. Es van obtenir resultats equiparables en totes les variables estudiades menys en la supervivència que va ser significativament inferior amb el sistema tancat que amb el obert (82.9% i 91.0% respectivament) (Papatheodorou *et al.*, 2013). Tot i que els mètodes tancats més optimitzats poden ser una alternativa als sistemes oberts, es necessari més estudis que demostrin de manera consistent uns resultats equiparables i reproduïbles a la vitrificació amb sistemes oberts.

A més, es poden prendre diferents mesures complementaries per evitar al màxim la possibilitat de contaminació. En primer lloc, s'ha de tenir en compte que la incorporació de tancs de Nitrogen en fase vapor minimitza el risc de contaminació creuada (Cobo *et al.*, 2010b). En segon lloc, s'han desenvolupat diferents mètodes per esterilitzar el NL_2 com es l'ús de radiació ultraviolada (UV) en el cas d'utilitzar sistemes oberts introduint el suport amb la mostra vitrificada en un contenidor que es tanca hermèticament abans de introduir en el tanc d'emmagatzematge (Parmegiani *et al.*, 2011, 2012).

Un altre punt de controvèrsia en els actuals sistemes de vitrificació, es el factor humà. S'ha demostrat com la vitrificació pot ser un mètode molt operador depenent, fent que puguin existir grans diferències en el resultats entre clíniques i, fins i tot, entre embriòlegs d'un mateix laboratori (Gosden, 2011).

Recentment s'ha publicat el primer estudi en humans implementant un sistema de vitrificació semi-automàtic utilitzant un sistema tancat (Roy *et al.*, 2014). Aquests autors han demostrat resultats equiparables als reportats fins ara amb els sistemes oberts. Amb aquest mètode, tot i no arribar a les taxes de refredament i escalfament a les que s'arriba amb els sistemes oberts, s'incrementen en gran mesura respecte altres sistemes tancats. Sistemes

com aquest podrien representar una alternativa en els laboratoris de criopreservació que permetria eliminar el factor humà.

4.3.3 *Indicacions*

Creació de bancs

L'optimització en la criopreservació oocitària ha permès la creació de bancs d'oòcits simplificant en gran mesura els programes de donació. Tradicionalment, els cicles de les receptores d'oòcits requerien ser sincronitzats amb els cicles de les donants. La vitrificació d'oòcits permet organitzar el cicle de la receptora en el moment més convenient i a més proporciona el temps suficient per poder realitzar les proves necessàries abans de la donació, incloent-hi la quarantena per l'anàlisi de possibles infeccions en la donant. Aquesta possibilitat equipararia la donació d'oòcits amb la de semen pel què fa a la seguretat biològica.

Preservació de fertilitat

Els desenvolupaments assolits en criopreservació d'oòcits en l'última dècada, també han suposat un punt i a part en el camp de la preservació de la fertilitat femenina atorgant a la dona total autonomia (Homburg *et al.*, 2009).

Les indicacions per la preservació de la fertilitat femenina es poden classificar en tres categories: dany iatrogènic gonadal (quimioteràpia i radioteràpia, majoritàriament per tractaments oncològics), predisposició genètica a una fallada ovàrica prematura (menopausa precoç) i pèrdua de fertilitat deguda a l'edat. La vitrificació d'oòcits representa una eina valuosa per la preservació de la fertilitat malgrat cal ser prudents i tenir en compte l'escàs nombre de naixements reportats a partir de la vitrificació d'oòcits en pacients oncològiques (Sánchez-Serrano *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Garcia-Velasco *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2014). Tot i que la majoria de casos reportats són amb vitrificació d'oòcits, amb anterioritat a aquestes publicacions s'han reportat naixements amb la tècnica de congelació lenta (Yang *et al.*, 2007; Porcu *et al.*, 2008). Tant l'ASRM com l'ESHRE han publicat recomanacions respecte de la preservació de la fertilitat aconsellant dur-la a terme abans dels 35 anys (ESHRE Task Force on Ethics and Law *et al.*, 2012; Practice Committees of ASRM and SART, 2013).

Transferència diferida

Està en debat actualment la possibilitat de dur a terme una transferència diferida (Shapiro *et al.*, 2014; Weinerman and Mainigi, 2014; Wong *et al.*, 2014). Això implicaria la criopreservació dels oòcits o embrions obtinguts en el cicle d'estimulació i la posterior transferència embrionària en un cicle natural o artificial, evitant així un ambient uterí advers degut als elevats nivells d'estradiol derivats de l'estimulació ovàrica per tal d'aconseguir una millor taxa d'embaràs (Roque *et al.*, 2013; Shapiro *et al.*, 2013). Aquesta estratègia està plenament justificada en pacients amb risc de desenvolupar un SHO (Herrero *et al.*, 2011) o en pacients amb nivells inadequats de progesterona (Santos-Ribeiro *et al.*, 2014; Sonigo *et al.*, 2014).

D'altra banda, s'ha reportat en diferents estudis epidemiològics un augment en els resultats perinatals adversos, inclòs el baix pes gestacional, en cicles de FIV amb transferència dels embrions en fresc comparat amb el resultat de les transferències d'embrions criopreservats. Aquestes diferències no es fan evidents en receptores d'oòcits, abonant la idea de què l'ambient uterí en els cicles estimulats pot ser el responsable d'una deficient implantació (Kalra *et al.*, 2011; Maheshwari *et al.*, 2012; Pinborg *et al.*, 2013; Wennerholm *et al.*, 2013; Ishihara *et al.*, 2014).

Caldria però determinar quina seria l'estratègia més eficient en la transferència diferida entre la criopreservació d'oòcits o d'embrions.

Cal tenir en compte que la transferència diferida pot implicar una doble criopreservació (primer els oòcits i seguidament els embrions supernumeraris) tot i que s'ha demostrat, tant en el estudi inclòs en la present tesis (vegeu article IV: How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes) com en l'estudi publicat per Cobo i col·laboradors (Cobo *et al.*, 2013), que aquesta no sembla afectar ni la viabilitat embrionària ni la taxa d'embaràs evolutiu.

Acumulació d'oòcits

La vitrificació d'oòcits està resultant també de gran utilitat en els casos en què es desitja acumular-los en pacients amb baixa resposta a l'estimulació ovàrica. S'ha descrit aquesta estratègia en casos de cicles de DGP (Cobo *et al.*, 2012c; Forman *et al.*, 2012).

Com en el cas de transferència diferida, caldria determinar si és més eficaç criopreservar oòcits o embrions en aquests casos.

La criopreservació d'òocits i embrions ha representat un gran avenç en les tècniques de reproducció assistida i ha permès incrementar l'eficiència d'aquestes tècniques i ampliar-ne el ventall d'indicacions com en el cas de la preservació de la fertilitat.

5. Conclusions

- 1) S'ha establert una correlació directa entre la taxa d'implantació i l'estadi de desenvolupament dels embrions en fresc abans de la congelació, la seva supervivència després de la descongelació i la seva evolució després del cultiu overnight. A partir d'aquest paràmetres s'ha desenvolupat un *score* aplicable a embrions de primerencs congelats/descongelats.
- 2) S'ha descrit el primer naixement en un programa de DGP a partir d'un blastocist vitrificat diagnosticat com a normal. També s'ha demostrat la superioritat de les solucions i eines per a la vitrificació comercials en front les preparades en els propis laboratoris.
- 3) No s'han obtingut diferències en cap dels paràmetres estudiats en comparar la taxa de fecundació, la qualitat embrionària, la taxa d'embaràs evolutiu o la taxa de nen nascut viu a casa entre el grup de receptores d'oòcits en fresc i vitrificats, sent aquest estudi comparatiu entre oòcits de la mateixa cohort de la donant. Tampoc la doble vitrificació ha influït en els resultats obtenint la mateixa taxa de supervivència i d'embaràs evolutiu.

6. Bibliografia

A

- Al-Hasani S, Diedrich K, Ven H van der, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987;2:695–700.
- Ali J, Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil* 1993;99:471–477.
- Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Paixao CL, Pereira PC. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum Reprod* 2010a;25:1192–1198.
- Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Paixao CL, Pereira PC. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum Reprod* 2010b;25:1192–1198.
- Alpha Scientists In Reproductive Medicine. The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online* 2012;25:146–167.
- Alvarez M, Solé M, Devesa M, Fábregas R, Boada M, Tur R, Coroleu B, Veiga A, Barri PN. Live birth using vitrified--warmed oocytes in invasive ovarian cancer: case report and literature review. *Reprod Biomed Online* 2014;28:663–668.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007;14:72–79.
- Ashwood-Smith M. In *Temperature and Animal Cells*. In K Bowler and BJ Fuller, editor. 1987;395–406. Company of Biologist, Cambridge.

B

- Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, Gardner DK. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod* 2008;23:1976–1982.

- Balaban B, Yakin K, Isiklar A, Urman B. Utilization of high-security straws for embryo freezing in an in vitro fertilization program: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2007;87:691–696.
- Bianchi V, Lappi M, Bonu MA, Borini A. Oocyte slow freezing using a 0.2-0.3 M sucrose concentration protocol: is it really the time to trash the cryopreservation machine? *Fertil Steril* 2012;97:1101–1107.
- Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003;46:146–152.
- Boer KA de, Catt JW, Jansen RPS, Leigh D, McArthur S. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertil Steril* 2004;82:295–298.
- Boutron P, Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the system water–glycerol–dimethylsulfoxide. *Cryobiology* 1978;15:93–108.
- Bricka M, Bessis M. [Preservation of erythrocytes by freezing in the presence of polyvinylpyrrolidone and dextran]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1955;149:875–877.
- Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 1953;172:767–768.

C

- Chang C-C, Elliott TA, Wright G, Shapiro DB, Toledo AA, Nagy ZP. Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years. *Fertil Steril* 2013a;99:1891–1897.
- Chang L-J, Huang C-C, Tsai Y-Y, Hung C-C, Fang M-Y, Lin Y-C, Su Y-N, Chen S-U, Yang Y-S. Blastocyst biopsy and vitrification are effective for preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases. *Hum Reprod* 2013b;28:1435–1444.
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1:884–886.
- Chen Y-L, Hung C-C, Lin S-Y, Fang M-Y, Tsai Y-Y, Chang L-J, Lee C-N, Su Y-N, Chen S-U, Yang Y-S. Successful application of the strategy of blastocyst biopsy,

vitrification, whole genome amplification, and thawed embryo transfer for preimplantation genetic diagnosis of neurofibromatosis type 1. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2011;50:74–78.

Cobo A, Bellver J, los Santos MJ de, Remohí J. Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2012a;97:74–78.

Cobo A, Castellò D, Vallejo B, Albert C, los Santos JM de, Remohí J. Outcome of cryotransfer of embryos developed from vitrified oocytes: double vitrification has no impact on delivery rates. *Fertil Steril* 2013;99:1623–1630.

Cobo A, Garrido N, Crespo J, José R, Pellicer A. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online* 2012b;24:424–432.

Cobo A, Garrido N, Crespo J, José R, Pellicer A. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online* 2012c;24:424–432.

Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008;89:1657–1664.

Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010a;25:2239–2246.

Cobo A, Romero JL, Perez S, los Santos MJ de, Meseguer M, Remohi J. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril* 2010b;94:1903–1907.

Cohen J, Simons RF, Fehilly CB, Fishel SB, Edwards RG, Hewitt J, Rowland GF, Steptoe PC, Webster JM. Birth after replacement of hatching blastocyst cryopreserved at expanded blastocyst stage. *Lancet* 1985;1:647.

D

Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, Goldfarb J. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. *Reprod Biomed Online* 2007;14:208–213.

E

Edashige K, Tanaka M, Ichimaru N, Ota S, Yazawa K, Higashino Y, Sakamoto M, Yamaji Y, Kuwano T, Valdez DM, et al. Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biol Reprod* 2006;74:625–632.

Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biol Reprod* 2003;68:87–94.

Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2012;18:536–554.

El-Danasouri I, Selman H. Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos. *Fertil Steril* 2001;76:400–402.

El-Toukhy T, Kamal A, Wharf E, Grace J, Bolton V, Khalaf Y, Braude P. Reduction of the multiple pregnancy rate in a preimplantation genetic diagnosis programme after introduction of single blastocyst transfer and cryopreservation of blastocysts biopsied on Day 3. *Hum Reprod* 2009;24:2642–2648.

ESHRE Task Force on Ethics and Law I, Dondorp W, Wert G de, Pennings G, Shenfield F, Devroey P, Tarlatzis B, Barri P, Diedrich K. Oocyte cryopreservation for age-related fertility loss. *Hum Reprod* 2012;27:1231–1237.

F

Fahy GM, Levy DI, Ali SE. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* 1987;24:196–213.

- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984;21:407–426.
- Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, Treff NR, Scott RT. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:100–7.
- Forman EJ, Li X, Ferry KM, Scott K, Treff NR, Scott RT. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertil Steril* 2012;98:644–649.
- Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod* 2008;23:2596–2608.

G

- Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martínez M, Carmona L, Pellicer A. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril* 2013;99:1994–1999.
- Goldman KN, Noyes NL, Knopman JM, McCaffrey C, Grifo JA. Oocyte efficiency: does live birth rate differ when analyzing cryopreserved and fresh oocytes on a per-oocyte basis? *Fertil Steril* 2013;100:712–717.
- Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WI. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum Reprod* 1994;9:684–691.
- Gook DA, Osborn SM, Johnston WI. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993;8:1101–1109.
- Gook DA, Schiwe MC, Osborn SM, Asch RH, Jansen RP, Johnston WI. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1995;10:2637–2641.

Gosden R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. *Fertil Steril* 2011;96:264–268.

Grifo JA, Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril* 2010;93:391–396.

Grossmann M, Santaló J. Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol* 1991;42:87–108.

Gutiérrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munné S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011;95:953–958.

H

Hartshorne GM, Elder K, Crow J, Dyson H, Edwards RG. The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum Reprod* 1991;6:136–141.

Herrero L, Pareja S, Losada C, Cobo AC, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Avoiding the use of human chorionic gonadotropin combined with oocyte vitrification and GnRH agonist triggering versus coasting: a new strategy to avoid ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2011;95:1137–1140.

Homburg R, Veen F van der, Silber SJ. Oocyte vitrification--women's emancipation set in stone. *Fertil Steril* 2009;91:1319–1320.

Hotamisligil S, Toner M, Powers RD. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol Reprod* 1996;55:161–168.

Hsieh YY, Tsai HD, Chang CC, Lo HY, Lai AC. Ultrarapid cryopreservation of human embryos: experience with 1,582 embryos. *Fertil Steril* 1999;72:253–256.

I

Ishihara O, Araki R, Kuwahara A, Itakura A, Saito H, Adamson GD. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: an analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan. *Fertil Steril* 2014;101:128–133.

Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y, Seike N, Kainuma H. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology* 1993;40:427–433.

J

Jackowski S, Leibo SP, Mazur P. Glycerol permeabilities of fertilized and infertilized mouse ova. *J Exp Zool* 1980;212:329–341.

Joris H, Abbeel E Van den, Vos AD, Steirteghem A Van. Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Hum Reprod* 1999;14:2833–2837.

K

Kalra SK, Ratcliffe SJ, Coutifaris C, Molinaro T, Barnhart KT. Ovarian stimulation and low birth weight in newborns conceived through in vitro fertilization. *Obstet Gynecol* 2011;118:863–871.

Karow AM. Cryoprotectants--a new class of drugs. *J Pharm Pharmacol* 1969;21:209–223.

Kasai M, Edashige K. Vitrification in animal reproduction: vitrification of embryos using conventional straws with an ethylene glycol-based solutions. In Tucker MJ, Liebermann J, editors. 2007;75–86.

Kasai M, Komi J, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990;89:91–97.

- Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T, Edashige K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology* 1996;33:459–464.
- Kaufman RA, Menezo Y, Hazout A, Nicollet B, DuMont M, Servy EJ. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1995;64:1125–1129.
- Keskintepe L, Sher G, Machnicka A, Tortoriello D, Bayrak A, Fisch J, Agca Y. Vitrification of human embryos subjected to blastomere biopsy for pre-implantation genetic screening produces higher survival and pregnancy rates than slow freezing. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:629–635.
- Kim MK, Lee DR, Han JE, Kim YS, Lee WS, Won HJ, Kim JW, Yoon TK. Live birth with vitrified-warmed oocytes of a chronic myeloid leukemia patient nine years after allogenic bone marrow transplantation. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:1167–1170.
- Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Stavrou D, Jones GM, Cram DS, Makrakis E, Trounson AO, Kanavakis E, Pantos K. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod* 2007;22:1443–1449.
- Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 1999;38:119–130.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005a;11:300–308.
- Kuwayama M, Vajta GG, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005b;11:608–614.

L

- Landuyt L Van, Velde H Van de, Vos A De, Haentjens P, Blockeel C, Tournaye H, Verheyen G. Influence of cell loss after vitrification or slow-freezing on further in vitro development and implantation of human Day 3 embryos. *Hum Reprod* 2013;28:2943–2949.
- Landuyt L Van, Verpoest W, Verheyen G, Vos A De, Velde H Van de, Liebaers I, Devroey P, Abbeel E Van den. Closed blastocyst vitrification of biopsied embryos: evaluation of 100 consecutive warming cycles. *Hum Reprod* 2011;26:316–322.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999;72:1073–1078.
- Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril* 1985;44:645–651.
- Lathi RB, Massie JAM, Gilani M, Milki AA, Westphal LM, Baker VL, Behr B. Outcomes of trophoctoderm biopsy on cryopreserved blastocysts: a case series. *Reprod Biomed Online* 2012;25:504–507.
- Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 2006;86:20–26.
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008;90:186–193.
- Luyet B. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica* 1937;1:1–14.

M

- Magli MC, Gianaroli L, Fortini D, Ferraretti AP, Munné S. Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum Reprod* 1999;14:770–773.
- Magli MC, Gianaroli L, Grieco N, Cefalù E, Ruvolo G, Ferraretti AP. Cryopreservation of biopsied embryos at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2006;21:2656–2660.

- Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2012;98:368–77.
- Martín J, Cervero A, Mir P, Martínez-Conejero JA, Conejero Martínez JA, Pellicer A, Simón C. The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril* 2013;99:1054–61.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996;54:1059–1069.
- Maximov N. Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren. *Ber Dtsch Bot Ges* 1912;30:52–65.
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, Boer KA de, Jansen RPS. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril* 2005;84:1628–1636.
- McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Hum Reprod* 1995;10:1163–1171.
- Ménézo Y, Nicollet B, Herbaut N, André D. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril* 1992;58:977–980.
- Mukaida T, Oka C, Goto T, Takahashi K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod* 2006;21:3246–3252.
- Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1998;13:2874–2879.

N

Nei T. Freezing injury to erythrocytes. I. Freezing patterns and post-thaw hemolysis. *Cryobiology* 1976;13:278–286.

Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferraretti AP, Kupka MS, Mouzon J de, Nygren KG, European IVF-monitoring (EIM) Consortium for the ES of HR and E (ESHRE). Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod* 2009;24:1267–1287.

P

Palermo G, Joris H, Devroey P, Steirteghem AC Van. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17–18.

Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Prapas N, Zikopoulos K, Georgiou I, Prapas Y. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Reprod Biomed Online* 2013;26:595–602.

Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN₂). *Fertil Steril* 2012;98:870–875.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M, et al. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:505–512.

Parmegiani L, Tatone C, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Arnone A, Maccarini AM, Emidio G Di, Vitti M, Filicori M. Rapid warming increases survival of slow-frozen sibling oocytes: a step towards a single warming procedure irrespective of the freezing protocol? *Reprod Biomed Online* 2014;28:614–623.

- Paynter SJ, Borini A, Bianchi V, Santis L De, Flamigni C, Coticchio G. Volume changes of mature human oocytes on exposure to cryoprotectant solutions used in slow cooling procedures. *Hum Reprod* 2005;20:1194–1199.
- Paynter SJ, Cooper A, Gregory L, Fuller BJ, Shaw RW. Permeability characteristics of human oocytes in the presence of the cryoprotectant dimethylsulphoxide. *Hum Reprod* 1999;14:2338–2342.
- Paynter SJ, O’Neil L, Fuller BJ, Shaw RW. Membrane permeability of human oocytes in the presence of the cryoprotectant propane-1,2-diol. *Fertil Steril* 2001;75:532–538.
- Peng W, Zhang J, Shu Y. Live birth after transfer of a twice-vitrified warmed blastocyst that had undergone trophectoderm biopsy. *Reprod Biomed Online* 2011;22:299–302.
- Pinborg A, Wennerholm UB, Romundstad LB, Loft A, Aittomaki K, Söderström-Anttila V, Nygren KG, Hazekamp J, Bergh C. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013;19:87–104.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;164:666.
- Polge C. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. *Nature* 1952;169:626–627.
- Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;68:724–726.
- Porcu E, Venturoli S, Damiano G, Ciotti PM, Notarangelo L, Paradisi R, Moscarini M, Ambrosini G. Healthy twins delivered after oocyte cryopreservation and bilateral ovariectomy for ovarian cancer. *2008;17:265–267.*
- Potdar N, Gelbaya TA, Nardo LG. Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2014;29:159–176.
- Practice Committees of ASRM and SART. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril* 2013;99:37–43.

R

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;313:573–575.

Rama Raju GA, Haranath GB, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online* 2005;11:434–437.

Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Vitrification of human early cavitating and deflated expanded blastocysts: clinical outcome of 474 cycles. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:523–529.

Rezazadeh Valojerdi M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:347–354.

Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, Colamaria S, Sapienza F, Ubaldi F. Embryo development of fresh “versus” vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010;25:66–73.

Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, Checa MA. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;99:156–162.

Roy TK, Brandi S, Tappe NM, Bradley CK, Vom E, Henderson C, Lewis C, Battista K, Hobbs B, Hobbs S, et al. Embryo vitrification using a novel semi-automated closed system yields in vitro outcomes equivalent to the manual Cryotop method. *Hum Reprod* 2014; pendent de publicació.

S

Saito N, Imai K, Tomizawa M. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 1994;41:1053–1060.

- Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escribá M-J, Simón C, Pellicer A. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2010;93:268.
- Santis L De, Coticchio G, Paynter S, Albertini D, Hutt K, Cino I, Iaccarino M, Gambardella A, Flamigni C, Borini A. Permeability of human oocytes to ethylene glycol and their survival and spindle configurations after slow cooling cryopreservation. *Hum Reprod* 2007;22:2776–2783.
- Santos-Ribeiro S, Polyzos NP, Haentjens P, Smitz J, Camus M, Tournaye H, Blockeel C. Live birth rates after IVF are reduced by both low and high progesterone levels on the day of human chorionic gonadotrophin administration. *Hum Reprod* 2014;29:1698–1705.
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010;94:1700–1706.
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophoctoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil Steril* 2013;100:615–619.
- Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT. Live birth outcome with trophoctoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertil Steril* 2011;96:638–640.
- Scott RT, Ferry K, Su J, Tao X, Scott K, Treff NR. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. *Fertil Steril* 2012;97:870–875.
- Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril* 2013;100:624–630.
- Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 2009;59:75–82.

- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *Fertil Steril* 2014;102:3–9.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Restrepo H, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Matched-cohort comparison of single-embryo transfers in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2013;99:389–392.
- Siebzehnuebl ER, Todorow S, Uem J van, Koch R, Wildt L, Lang N. Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol. *Hum Reprod* 1989;4:312–317.
- Sonigo C, Dray G, Roche C, Cédric-Durnerin I, Hugues J-N. Impact of high serum progesterone during the late follicular phase on IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2014;29:177–186.
- Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005;11:53–57.
- Steponkus PL, Myers SP, Lynch D V, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt RE, Lin TT, MacIntyre RJ. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature* 1990;345:170–172.
- Stoop D, Munck N De, Jansen E, Platteau P, Abbeel E Van den, Verheyen G, Devroey P. Clinical validation of a closed vitrification system in an oocyte-donation programme. *Reprod Biomed Online* 2012;24:180–185.
- Stout D. [First English Translation of] “Untersuchungen über Das Erfrieren der Pflanzten” (Investigations into the freezing of plants); [Monograph by H. Molisch, 1897.]. *CryoLetters* 1982;3:331–390.

T

- Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: A 4-year follow-up study. *Fertil Steril* 2005;84:88–92.

Tammann G. Ueber die abh angigkeit der Kernr, welche sich in verschiedenen flussigkeiten bilden, von der temperature. *Zeitschrift f ur Phys Chemie* 1898;25:441–479.

Taylor TH, Patrick JL, Gitlin SA, Michael Wilson J, Crain JL, Griffin DK. Outcomes of blastocysts biopsied and vitrified once versus those cryopreserved twice for euploid blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online* 2014;29:59–64.

Treff NR, Tao X, Ferry KM, Su J, Taylor D, Scott RT. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2012;97:819–824.

Trokoudes KM, Pavlides C, Zhang X, D KMTM, Sc CPM, D XZMDP. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertil Steril* 2011;95:1996–2000.

Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305:707–709.

U

Uem JF van, Siebzehnr ubl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987;1:752–753.

V

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53–58.

Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12:779–796.

Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santal o J, Barri PN, M en ezo Y. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote* 1997;5:351–354.

W

- Wang X, Zhang X, Qin Y, Hao D, Shi H. Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:883–889.
- Weinerman R, Mainigi M. Why we should transfer frozen instead of fresh embryos: the translational rationale. *Fertil Steril* 2014;102:10–18.
- Wennerholm U-B, Henningsen A-KA, Romundstad LB, Bergh C, Pinborg A, Skjaerven R, Forman J, Gissler M, Nygren KG, Tiitinen A. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod* 2013;28:2545–2553.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 1972;178:411–414.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2003;80:860–868.
- Wininger JD, Taylor TH, Orris JJ, Glassner M, Anderson SH. Pregnancy after rebiopsy and vitrification of blastocysts following allele dropout after day 3 biopsy. *Fertil Steril* 2011;95:1122.
- Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril* 2014;102:19–26.
- Wu B, Lu S, Gelety TJ. The Blastocyst Embryo Cryopreservation After Blastomere Biopsy on Day 3 for Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD). *Fertil Steril* 2005;84:S180.
- Wu J, Zhang L, Wang X. In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 2001;121:389–393.

Y

Yang D, Brown SE, Nguyen K, Reddy V, Brubaker C, Winslow KL. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. *Fertil Steril* 2007;87:1469.

Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, Sills ES, Salem RD. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24.

Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, Araki Y. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum Reprod* 2000;15:1–2.

Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ, Cha KY, Choi DH. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2000;74:180–181.

Z

Zech NH, Lejeune B, Zech H, Vanderzwalmen P. Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. *Reprod Biomed Online* 2005;11:355–361.

Zeilmaker GH, Alberda AT, Gent I van, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984;42:293–296.

Zhang X, Trokoudes KM, Pavlides C. Vitrification of biopsied embryos at cleavage, morula and blastocyst stage. *Reprod Biomed Online* 2009;19:526–531.

Zheng WT, Zhuang GL, Zhou CQ, Fang C, Ou JP, Li T, Zhang MF, Liang XY. Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non-transferable embryos. *Hum Reprod* 2005;20:1615–1618.

