

26. Congelación embrionaria

INTRODUCCIÓN

La congelación embrionaria tiene por objeto conservar los embriones sobrantes de un tratamiento de reproducción asistida tras la transferencia embrionaria, o bien todos los embriones obtenidos en el laboratorio en caso de que dicha transferencia no se pueda llevar a cabo.

Estos embriones se conservan y almacenan congelados en tanques adecuados que contienen nitrógeno líquido (-196 °C). Su descongelación posterior permite la transferencia en un momento distinto del ciclo en el que se produjeron los embriones.

La legislación española establece la obligatoriedad de criopreservar todos los embriones viables sobrantes procedentes de un ciclo de reproducción asistida. Además, se establece que los centros de Reproducción Asistida deberán estar dotados de los medios humanos y materiales, así como de los recursos técnicos adecuados y de un seguro obligatorio para los bancos de preembriones.

Tanto la congelación de preembriones como los destinos posibles de los preembriones congelados, están regulados en la Ley 14/2006 del 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida.

Se debe tener tanto el material como el equipo humano y técnico adecuado, así como las infraestructuras necesarias para la realización de la congelación embrionaria. (ver Guidelines ASEBIR), (Real Decreto nº 413/1996 del 1 de marzo).

En el caso de donación de embriones también se debe contemplar, como en la donación de gametos, que los progenitores hayan sido estudiados para diversas enfermedades infecciosas transmisibles (RD 412/1996, Artículo 4), y en el caso de ser necesaria una segunda prueba, mantener los embriones congelados en contenedores de cuarentena.

Se deben realizar estudios sistemáticos de enfermedades infecciosas transmisibles (VIH, hepatitis B y C, sífilis, etc.) a todos los pacientes y donantes cuyos embriones puedan ser congelados, por si éstos son susceptibles de ser posteriormente donados a otras parejas.	RSAA
En todos los centros que realicen FIV-ICSI debe contarse con un programa de congelación embrionaria.	RSAA
Se recomienda disponer de un contenedor de nitrógeno líquido de cuarentena para almacenar los embriones procedentes de progenitores o donantes con sospecha de portar alguna enfermedad infecciosa transmisible.	RSAA

Atendiendo a la seguridad del almacenamiento de las muestras biológicas, y en este caso concreto de embriones, hay que tener en cuenta que hay diversos estudios que muestran que no se tienen evidencias de contaminación cruzada en los tanques de congelación⁽¹⁾ de embriones o semen. Sin embargo, hay otros autores que han descrito el aislamiento de virus en el nitrógeno líquido⁽²⁾. Por todo ello, se debe realizar la congelación de los embriones en viales o pajuelas que vayan herméticamente cerradas (alta seguridad biológica)^(3,4), ya que hay peligro de rotura de pajuelas o criotubos que podrían contaminar el tanque⁽⁵⁾. Por lo tanto, es aconsejable realizar una labor de limpieza y revisión anual de los tanques al igual que sería conveniente poder disponer de diversos bancos: para semen, para embriones, para las muestras de cuarentena, y otro para aquellas muestras infectadas.

Para evitar posibles contaminaciones cruzadas en el interior de los criobancos, los embriones deben ser congelados en pajuelas o viales herméticamente cerrados.	C
Se recomienda disponer de varios tanques criogénicos para distribuir los distintos tipos de muestras a congelar y almacenar.	RSAA

Respecto al tiempo que pueden permanecer congelados los embriones antes de ser transferidos al útero con éxito, en España la ley 14/2006, del 26 de mayo establece : “... por un plazo equivalente a la vida fértil de la mujer con el objeto de que se le puedan transferir en intentos posteriores.” Existen escasos estudios en los que se evalúe la viabilidad embrionaria tras largos periodos de criopreservación, ya que la congelación de embriones humanos se realiza desde hace algo más de veinte años. Aun así, existe un caso donde se descongelaron unos embriones, después de llevar 12 años congelados, que produjeron un embarazo gemelar⁽⁶⁾.

Los resultados que se obtienen después de transferir los embriones descongelados, aunque van a depender de un conjunto de características, se puede hablar en términos gene-

rales de que la congelación/descongelación embrionaria hace que las tasas globales de embarazo (acumuladas) en un programa de FIV, aumenten aproximadamente entre un 1-10%⁽⁷⁾. La Federación Francesa de embriólogos clínicos publicó los resultados de un periodo de nueve años, donde se trabajó con 102.821 embriones congelados. La supervivencia a la descongelación fue de un 55%. Encontraron más variabilidad con los congeladores programables, ya que a un 68% de los embriones que sobrevivieron a la descongelación se les realizó el *seeding* manual (con un 15% de embarazo por transferencia) frente a un 42% en el caso de *seeding* automático (con un 9% de embarazo por transferencia). También concluyen que la congelación embrionaria no tiene efectos adversos sobre la tasa de anomalías en el nacimiento (1,8%)⁽⁸⁾. Resultado que comparten los fineses, quienes a pesar de transferir un solo embrión, aseguran que la existencia de un buen programa de congelación embrionaria ayuda a que la tasa de embarazo sea muy aceptable con menor riesgo de embarazo múltiple⁽⁹⁾.

Los mejores resultados referidos a supervivencia embrionaria, tasa de embarazo e implantación, tras la descongelación de embriones congelados, se obtiene utilizando congeladores biológicos con *seeding* manual.

C

Las criotransferencias se pueden realizar tanto en ciclos naturales como en ciclos artificiales o sustituidos, en los que se utilizan hormonas para la preparación del endometrio (estrógenos y gestágenos con o sin análogos). Estudiando grupos comparables en edad, historia clínica, número de ovocitos recuperados y otros parámetros, se vio que los resultados en cuanto a tasa de embarazo con embriones descongelados en ciclos naturales y artificiales, son similares^(10,11).

CONGELACIÓN DE ZIGOTOS

En cuanto a los aspectos técnicos y biofísicos de la congelación celular, ésta requiere previamente deshidratar la célula lo máximo posible, con el fin de evitar durante el proceso, la formación de cristales de hielo en su interior. Para conseguirlo se utilizan sustancias crioprotectoras que van sustituyendo al agua que sale de la célula por el crioprotector que entra, produciendo el llamado efecto soluto. Estos agentes crioprotectores denominados permeables son el 1,2-propanodiol (PROH), el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol. Normalmente se suelen utilizar conjuntamente con otros crioprotectores no permeables, como la sacarosa, que actúa ejerciendo un efecto hiperosmolar⁽¹²⁾. Para intentar que no se formen cristales de hielo intracelulares se procede a la inducción de la formación de hielo en el medio circundante (nucleación) en un lugar alejado de las células o embriones, proceso conocido como *seeding*. Por último, se suele añadir albúmina al medio de congelación, para evitar que la zona pelúcida se endurezca en el proceso de la congelación⁽¹³⁾.

Inicialmente se usó el DMSO y la sacarosa en los protocolos de congelación de embriones, sobre todo en animales y también en humanos, pero fue sustituido por el PROH porque daba mejores resultados⁽¹⁴⁾. También el protocolo de congelación embrionaria en estadio de cigoto está bien definido y se basa en el formulado por Lasalle y Testart^(15,16), el cual consiste en una congelación lenta con PROH y sacarosa como agentes crioprotectores.

Los cigotos deben congelarse con una velocidad lenta y utilizando como crioprotectores 1,2-propanodiol (PROH) y sacarosa.

C

Teniendo en cuenta que los agentes crioprotectores son sustancias tóxicas, conviene que el proceso de congelación se ajuste al máximo a los tiempos indicados en los protocolos e instrucciones de los medios comerciales en su caso. Se debe disponer de todo el material necesario antes de comenzar con el primer paso de la congelación, así como haber registrado y localizado la futura ubicación de los cigotos en el banco. Durante el procedimiento de congelación cabe destacar la importancia de las temperaturas, de atemperar los medios sin calefactarlos y de ajustar al máximo los tiempos de cada paso. Sería conveniente no congelar cigotos/embriones de muchas pacientes a la vez porque se podría producir un decalaje de tiempos entre unos y otros, lo que conllevaría a un perjuicio de los propios embriones. El procedimiento de carga de los embriones consiste en dejar el medio que contiene los cigotos entre dos burbujas de aire que están flanqueadas a su vez por medio. Se debe ser cuidadoso al cargarlo y en el caso de congelar varias pajuelas a la vez, intentar que las distintas fases queden a una altura aproximada para que en la realización del *seeding* manual se haga contacto en zonas alejadas de los embriones. Por supuesto, también es conveniente que el material que se vaya a usar para hacer el *seeding* se introduzca con suficiente antelación en nitrógeno líquido.

El proceso de congelación debe realizarse ajustando al máximo los tiempos, las temperaturas, los materiales y los medios de congelación.

RSAA

Sería conveniente no congelar cigotos/embriones de muchas pacientes a la vez porque se podría producir un decalaje de tiempos entre unos y otros, lo que conllevaría a un perjuicio de los propios embriones.

RSAA

Los resultados en cuanto a la supervivencia en la descongelación de los cigotos pueden variar entre el 60-80% y las tasas de embarazo entre un 15-30% según los distintos tra-

bajos publicados⁽¹⁷⁻²⁰⁾. Incluso se habla de que los cigotos descongelados presentan el mismo potencial implantatorio que en fresco. Ya en 1993, Veeck *et al.*⁽²¹⁾, concluían que de los 3.731 cigotos congelados de su estudio, sobrevivían el 68%, siendo la tasa de embarazo del 29%.

Los trabajos publicados respecto a la posible influencia de la técnica de reproducción asistida empleada, FIV convencional o microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), parecen indicar que los cigotos congelados procedentes de ICSI tienen una tasa de supervivencia algo menor que los de FIV, y que su desarrollo y capacidad implantatoria pueden verse afectados por la congelación^(22,23). Sin embargo, la mayoría de trabajos no encuentran diferencias en cuanto a las tasas de supervivencia o embarazo según sean cigotos procedentes de FIV o de ICSI^(24,25), aunque estos estudios han trabajado con un menor número de embriones (< 3.000) en comparación al trabajo de Mandelbaum *et al.* que trabajaron con 14.222 embriones.

CONGELACIÓN DE EMBRIONES EN ESTADIOS TEMPRANOS DE DESARROLLO

El protocolo de congelación para los embriones en estadios tempranos de desarrollo, es decir, en estadio desde 2 hasta 8-10 células, es el mismo que el que utilizamos para embriones en estadio de cigoto⁽²⁶⁾. Además, se deben aplicar todas las consideraciones que se han indicado en la congelación de cigotos en cuanto a la rigurosidad a la hora de aplicar los tiempos y temperaturas, la colocación de los embriones en la pajueta, la realización del *seeding* y la rapidez de ubicación de los embriones.

Los embriones en estado multicelular de desarrollo se congelan según el mismo protocolo de congelación que los cigotos.

C

En este caso interviene un factor clave a la hora de valorar cómo puede funcionar la descongelación de embriones en desarrollo multicelular, y es la calidad del embrión la cual influye decisivamente en la supervivencia⁽²⁷⁾. La congelación de embriones de peor calidad lleva a tasas bajas de supervivencia y de implantación embrionarias⁽²⁸⁾. Es obvio que el proceso de congelación celular no es un hecho natural al cual las células estén *acostumbradas*. Por ello, a la hora de la descongelación de los embriones en estado multicelular hay que tener en cuenta cómo es su supervivencia. Normalmente se producen pérdidas de blastómeras respecto a las congeladas inicialmente. Sin embargo, parece existir una relación clara entre la calidad del embrión una vez descongelado y el éxito de embarazo, de tal manera que las criotransferencias realizadas con todos los embriones intactos, o al menos con uno de ellos

no dañado, tienen más probabilidad de producir embarazo que aquellas en las que los embriones tienen lisadas parte de sus blastómeras⁽²⁹⁻³²⁾. De alguna manera, cuanto más sano o mejor sea un embrión (más calidad), más probabilidades tendrá de sobrevivir a la descongelación embrionaria. Al margen estamos dejando otros factores que también influyen: edad de la paciente, número de oocitos recogidos inicialmente, si hubo transferencia previa o no en el ciclo en fresco, o la patología que subyace.

Está claro que los embriones con mucha fragmentación o con un desarrollo embrionario lento o bloqueado se deben descartar debido a la baja tasa de supervivencia demostrada después de la congelación. En el estudio de Karlstrom *et al.*⁽³³⁾, en el que realizaron 623 criotransferencias, observaron que la tasa de embarazo no se veía influenciada por el estado de división embrionaria, pero sí que había una tendencia a una menor tasa de embarazo cuando los embriones eran de peor calidad.

Se recomienda congelar sólo embriones de buena calidad.

RSAA

Otro hecho influyente en la descongelación de embriones multicelulares es el que se les haya aplicado alguna técnica de eclosión asistida (*assisted hatching*). Los embriones cuya zona pelúcida ha sido manipulada pierden más blastómeras al ser descongelados, y los embriones que aparecen intactos después de la descongelación parecen tener el mismo potencial implantatorio que los embriones en fresco⁽³⁴⁾.

Una manera de comprobar la viabilidad de los embriones tras la descongelación, es mantenerlos en el incubador 24 horas y así comprobar que se dividen y que, por lo tanto, son evolutivos.

La única forma de valorar si el embrión descongelado es evolutivo es dejarlo en incubación 24 horas y estudiar si sigue dividiéndose.

RSAA

CONGELACIÓN EN ESTADIO DE BLASTOCISTO

Los blastocistos son embriones preimplantatorios que han superado el punto crítico de la activación genómica. Sólo entre el 40 y 60% de los embriones consiguen llegar a blastocisto, por lo que el número de embriones a transferir y a congelar también se reduce.

En realidad, el cultivo y la congelación de blastocistos en los programas de FIV comenzaron a principios de los años 90 cuando fue posible obtener buenos blastocistos con los cocultivos. Después hubo una pequeña transición y adaptación al uso de los medios de cultivo secuenciales⁽³⁵⁾. La congelación en este estadio, tiene la dificultad teórica añadida de la gran cantidad de líquido que contiene el blastocele, que en la práctica se traduce en resultados muy variables tras descongelación. Desde el comienzo, la congelación de blastocistos se ha realizado en glicerol con protocolos lentos de varios pasos para que se produjera una buena difusión del crioprotector, ya que el número de células ha aumentado y cambia con ello la relación superficie/volumen⁽³⁶⁾. Sin embargo, ya se emplean protocolos cortos o de dos pasos con glicerol y sacarosa con los mismos o mejores resultados, 42,9% vs 16,9% de embarazo clínico cuando se utiliza el protocolo corto vs largo⁽³⁷⁾. En la serie presentada por Veeck *et al.*, 2004⁽³⁸⁾, obtienen un 76,3% de supervivencia a la descongelación de los 2259 blastocistos congelados/descongelados durante 3 años, con un resultado de tasa de embarazo clínico del 59,2%, por lo que concluyen que los blastocistos descongelados tienen un potencial implantatorio comparable a los embriones transferidos en día +3.

Al igual que sucede con los estadios multicelulares, la calidad de los blastocistos que van a ser congelados marcará el resultado que se obtendrá cuando éstos descongelen, es decir, a mejor calidad de blastocistos (blastocistos de día 5 o 6, expandidos y con masa celular interna de buena calidad morfológica⁽³⁹⁾) mayor probabilidad de éxito⁽⁴⁰⁾. También hay que añadir que es necesario dejar un tiempo de incubación de al menos 4 horas al finalizar la descongelación, para dar tiempo a que el blastocisto se recupere.

Alternativamente, se han descrito buenos resultados, en el caso de congelación de blastocistos, con la técnica de vitrificación, que consiste en un descenso ultrarrápido de temperatura que “solidifica” el blastocisto⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

Los blastocistos se congelan según un programa de congelación lento, con <i>seeding</i> manual y utilizando como crioprotectores el glicerol y la sacarosa, aunque también pueden congelarse por vitrificación.	C
Sólo se deben congelar blastocistos de buena calidad, que se presenten expandidos y con buena masa celular interna.	C
Los blastocistos que tras la descongelación muestran mejor tasa de supervivencia y de embarazo son los que han sido congelados en día +5 o día +6	C
Los blastocistos descongelados se deben dejar al menos 4 horas incubando antes del momento de la criotransferencia.	RSAA

Se puede hablar de una media de supervivencia en la descongelación de blastocistos de un 80% y de unas tasas de embarazo entre el 20-50%^(38,44,45). Tampoco se han visto diferencias en los resultados de supervivencia y embarazos entre congelar los blastocistos en día +5 o día +6⁽⁴⁶⁾, pero sí en día +7, cuyos resultados son peores⁽⁴⁶⁾. En general, los resultados de la congelación embrionaria en estadio de células son, si no mejores, sí más estables y reproducibles que los obtenidos en estadio de blastocisto, lo cual puede estar influido porque la práctica de la congelación en células está mucho más extendida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tomlinson M, Sakkas D. Is a review of standard procedures for cryopreservation needed? Safe and effective cryopreservation-should sperm banks and fertility centres move toward storage in nitrogen vapour? *Hum Reprod* 2000; 15: 2460-3.
2. Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003; 46: 146-52.
3. Letur-Konirsch H, Collin G, Sifer C, Devaux A, Kuttenn F, Madelenat P, Brun-Vezinet F, Feldman G, Benifla JL. Safety of cryopreservation straws for human gametes or embryos: a study with human immunodeficiency virus-1 under cryopreservation conditions. *Hum Reprod* 2003; 18: 140-4.
4. Benifla JL, Letur-Konirsch H, Collin G, Devaux A, Kuttenn F, Madelenat P, Brun-Vezinet F, Feldman G. Safety of cryopreservation straws for human gametes or embryos: a preliminary study with human immunodeficiency virus-1. *Hum Reprod* 2000; 15: 2186-9.
5. Steyaert SR, Leroux-Roels GG. Infections in IVF: review and guidelines. *Hum Reprod* 2000 Update; 6: 432-41.
6. Revel A, Safran A, Laufer N, Lewin A, Reubinov BE, Simon S. Twin deliver following 12 years of human embryo cryopreservation: case report. *Hum Reprod* 2004; 19: 328-9.
7. Trounson AO. Cryopreservation. *Br Med Bull* 1990; 46: 695-708.
8. BLEFCO. Human embryo cryopreservation: current state in France (1985-1993) French Federation of IVF Biologists. *Contracept Fertil Sex* 1996; 24: 229-32.
9. Tiitinen A, Halttunen M, Harkki P, Vuoristo P, Hyden-Granskog C. Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1140-4.
10. Sathanantan M, Macnamee MC, Rainsbury P, Wick K, Brinsden P, Edwards RG. Replacement of frozen-thawed embryos in artificial and natural cycles: a prospective semi-randomized study. *Hum Reprod* 1991; 6: 685-7.
11. NICE (National Institute for Clinical Excellence): Fertility assessment and treatment for people with fertility problems. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. (February 2004)
12. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood on intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47: 347-69.
13. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH. The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J Reprod Fertil* 1980; 89: 253-9.
14. Siebzehrnuebl ER, Todorow SJ, Van Uem J, 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: 312-7.
15. Lasalle 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: 645-51.
16. Testart J, Lasalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhom JD, Frydman R. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986; 46: 268-72.
17. Fugger EF, Bustillo M, Katz LP, Dorfmann AD, Beder SD, Schulman JD. Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleated human zygotes. *Fertil Steril* 1998; 50: 273-8.

18. Kattera S, Shrivastav P, Craft I. Comparison of pregnancy outcome of pronuclear- and multicellular-stage frozen-thawed embryo transfers. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 358-62.
19. Salumets A, Tuuri T, Makinen S, Vilksa S, Husu L, Tainio R, Suikkari AM. Effect of developmental stage embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod* 2003; 18: 1890-95.
20. Marrs RP, Greene J, Stone BA. Potential factors affecting embryo survival and clinical outcome with cryopreserved pronuclear human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1766-71.
21. Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ, De Scisciolo C, Maloney MK, Muasher SJ, Jones HW. Jr. Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993; 59: 1202-7.
22. Macas E, Imthurn B, Borsos M, Rosselli M, Maurer-Major E, Keller PJ. Impairment of the developmental potential of frozen-thawed human zygotes obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 630-5.
23. Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Álvarez S, Alnot MO, Salat-Baroux J. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod* 1998; 13(Suppl 3): 161-74
24. Al-Hasani S, Ludwig M, Gagsteiger F, Kupker W, Sturm R, Yilmaz A, Bauer O. Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1996; 11: 604-7.
25. Damario MA, Hammit DG, Galanits TM, Session DR, Dumesic DA. Pronuclear stage cryopreservation after intracytoplasmic sperm injection and conventional IVF: implications for timing of the freeze. *Fertil Steril* 2000; 73: 874.
26. Testart J, Lasalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhom JD, Frydman R. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986; 46: 268-72.
27. Kondo I, Suganuma N, Ando T, Asada Y, Furuhashi M, Tomoda, Y. Clinical factors for successful cryopreserved-thawed embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 201-6.
28. Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers, RD. A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo cryopreservation program. *Fertil Steril* 1993; 59: 1070-4.
29. Cohen J, Simons RS, Fehilly CB, Edwards RG. Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986; 3: 46-52.
30. Guerif F, Bidault R, Cadoret V, Couet ML, Lansac J, Royere D. Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal. *Hum Reprod* 2002; 17: 1321-6.
31. El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, Andritsos V, Taylor A, Braude P. Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril* 2003; 79: 1106-11.
32. Pal L, Kovacs P, Witt B, Jindal S, Santoro N, Barad D. Postthaw blastomere survival is predictive of the success of frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2004; 82: 821-6.
33. Karlstrom PO, Bergh T, Forsberg AS, Sandkvist U, Wikland M. Prognostic factors for the success rate of embryo freezing. *Hum Reprod* 1997; 12: 1263-6.
34. Edgar DH, Archer J, Gook DA, Jericho H, Wilton L, Bourne H. Survival and developmental potential of stored human early cleavage stage embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115 (Suppl 1): S8-S11.
35. Ménèzo YJ. Blastocyst freezing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115(Suppl 1): S12-5.
36. Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985; 2: 59-64.
37. Ding J, Pry M, Rana N, Dmowski WP. Improved outcome of frozen-thawed blastocysts transfer with Ménèzo's two-step thawing compared to the stepwise thawing protocol. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 203-210.
38. Veeck LL, Bodine R, Clarke RN, Berrios R, Libraro J, Moschini RM, Zaninovic N, Rosenwaks Z. High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts. *Fertil Steril* 2004; 82: 1418-27.
39. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993; 8: 2119-27.
40. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2000; 74: 282-7.

41. Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2004; 9:164-70.
42. Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril*. 2006; 86 :20-6.
43. 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 Aug 26. In press.
44. Kaufman RA, Ménèzo YJ, Hazout A, Nicollet B, Dumont M, Servy EJ. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1995; 64: 1125-9.
45. Ménèzo YJ, Ben Khalifa M. Cytogenetic and cryobiology of human cocultured embryos: a 3-year experience. *J Assist reprod Genet* 1995; 12: 35-40.
46. Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Bischof P, Sakkas D. The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998; 13: 676-81.

Bibliografía adicional

- Bredkjaer HE, Grudzinskas JG. Cryobiology in human assisted reproductive technology. Would Hippocrates approve? *Early Pregnancy* 2001; 5: 211-3.
- CAP (College of American Pathologists Reproductive Laboratory Accreditation Program). Laboratory Improvement. (2002). www.cap.org
- D'Angelo A, Amso N. Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002; 17: 2787-94.
- Fogarty NM, Maxwell WM, Eppleston J, Evans G. The viability of transferred sheep embryos after long-term cryopreservation. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12: 31-7.
- Gianaroli L, Plachot M, Van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, De Vos A, Magli MC, Mandelbaum J, Selva J, Van Inzen W. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod* 2000; 15: 2241-6
- Queenan JT Jr. Embryo freezing to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 79-83.
- Burns WN, Gaudet TW, Martin MB, Leal YR, Schoen H, Eddy CA, Schenken RS. Survival of cryopreservation and thawing with all blastomeres intact identifies multicell embryos with superior frozen embryo transfer outcome. *Fertil Steril* 1999; 72: 527-32.