

*Preservación de la fertilidad en
pacientes mayores de 35 años.
Rol del Ginecólogo*

*Curso Universitario de formación en
climaterio*

AAPEC – Córdoba

Mayo de 2017

Dra. Stella Lancuba

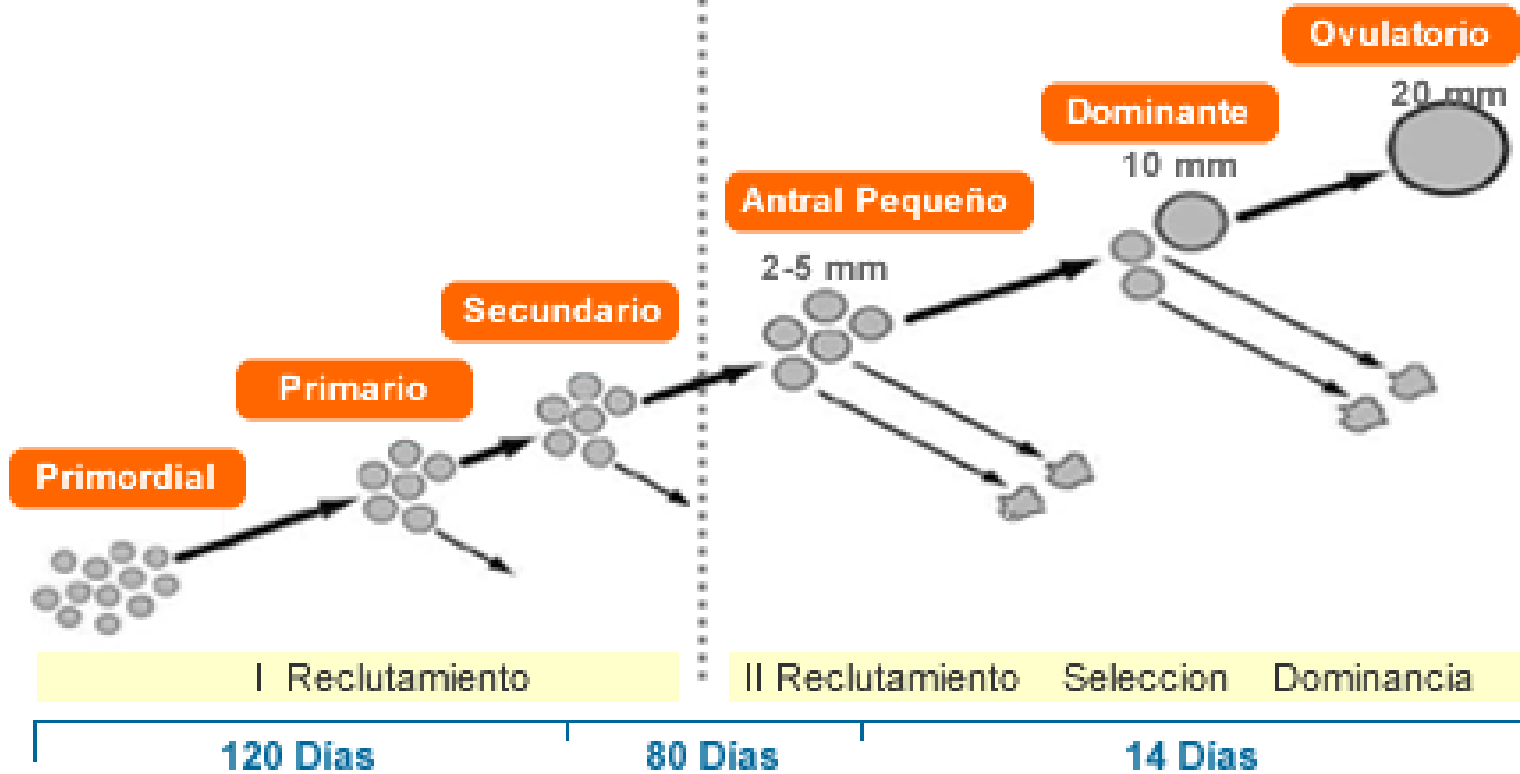
Control Paracrino

Independiente de
Gonadotropinas

Control Endócrino

Sensible a
gonadotropinas

Dependiente de
gonadotropinas



CAUSAS DEL FALLO OVÁRICO PREMATURO

Cromosómico/Genético

- Síndrome de Turner
- Síndrome de Swyer
- Síndrome de Insensibilidad a Andrógenos
- Síndrome Asociado con X Frágil
- Familiar

Defectos Enzimáticos /Metabólicos

- Galactosemia
- Talasemia Mayor Tratada con Múltiples Transfusiones de Sangre
- Hemocromatosis

Quimioterapia/Radioterapia

Extirpación Quirúrgica de los Ovarios

Infección Viral

Secreción o Acción Anormal de Gonadotropinas (FSH y LH)

Enfermedad Autoinmune.

- Disfunción Tiroidea
- Falla o Insuficiencia Poliglandular tipo I y II
- Hipoparatiroidismo
- Artritis Reumatoide
- Púrpura Trombocitopénica Idiopática (ITP)
- Diabetes
- Anemia Perniciosa
- Insuficiencia Suprarenal
- Vitiligo
- Lupus eritematoso sistémico

Feto 20 semanas



Nacimiento



Pubertad



6 millones de folículos
primordiales

1-2 millones de folículos
primordiales

500.000 folículos
primordiales

Signos de alarma POF

Relación FSH/LH = 2/1

AMH disminuída

Estradiol elevado

Acortamiento de los ciclos menstruales



Historical perspective

- *The generatione animalum - Reproduction in mammals - Edition B1 p. 6 (1651) “Ex ovo omnia”*
- *De Graaf de Mulierum organis - Generatione inservientibus 1672*
- *Edwards R, Seegars Jones y col. - Obstet Gynecol 1965 96,192 - G Am J*
- *Chen, Lancet 1986; 1 :884-6 - Pregnancy after human oocyte cryopreservation*

Oocyte slow cryopreservation

<i>Author</i>	<i>Pregnancy Rate</i>
• <i>Chen C.</i>	33%
• <i>Al Hasanis</i>	-
• <i>Bold</i>	30%
• <i>Fabbri R., Porcu, E.</i>	17%
• <i>Hunter</i>	25%
• <i>Toth</i>	21%
• <i>Yoon Tk</i>	-
• <i>Gook</i>	-

Slow-freeze method

TABLE 2

Results of oocyte cryopreservation using the slow-freeze method.

Parameter	1996–2004	2002–2004
Mean age (y) \pm SD	33.0 \pm 0.2	31.1 \pm 0.6
Survival, % (n)	55.4 (2,217/4,000)	69.2 (476/688)
Fertilization rate, % (n)	60.7 (1,346/2,217)	64.9 (309/476)
Implantation rate, % (n)	13.1 (122/929)	15.3 (34/222)
Live birth rate per transfer, % (n)	21.6 (76/351)	32.4 (24/74)

Note: Adapted from Oktay et al. (64).

Jain. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2006.

Método lento

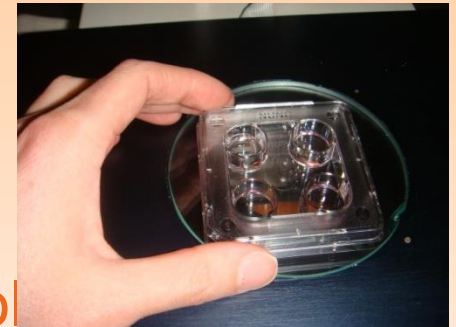
Potenciar deshidratación celular y disminuir la probabilidad de formación de hielo intracelular.

Protocolos más usados

PROH 1.5M+0.2M sacarosa

PROH 1.5M+0.3M sacarosa

PROH 1.5M+0.3M sacarosa y sustituto catión col



Temperatura de Inicio del programa: 16°C

-2.0 °C / minuto

- 7°C

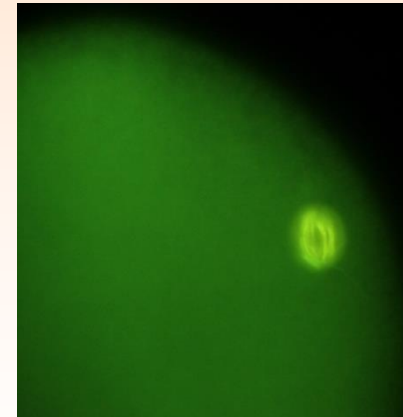
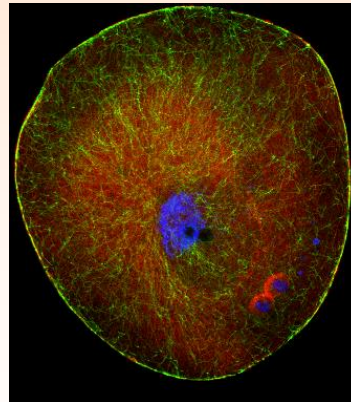
Espera de 5 minutos

Seeding manual a - 7°C

Espera de 5 minutos

- 0.3 °C / minuto

- 36°C

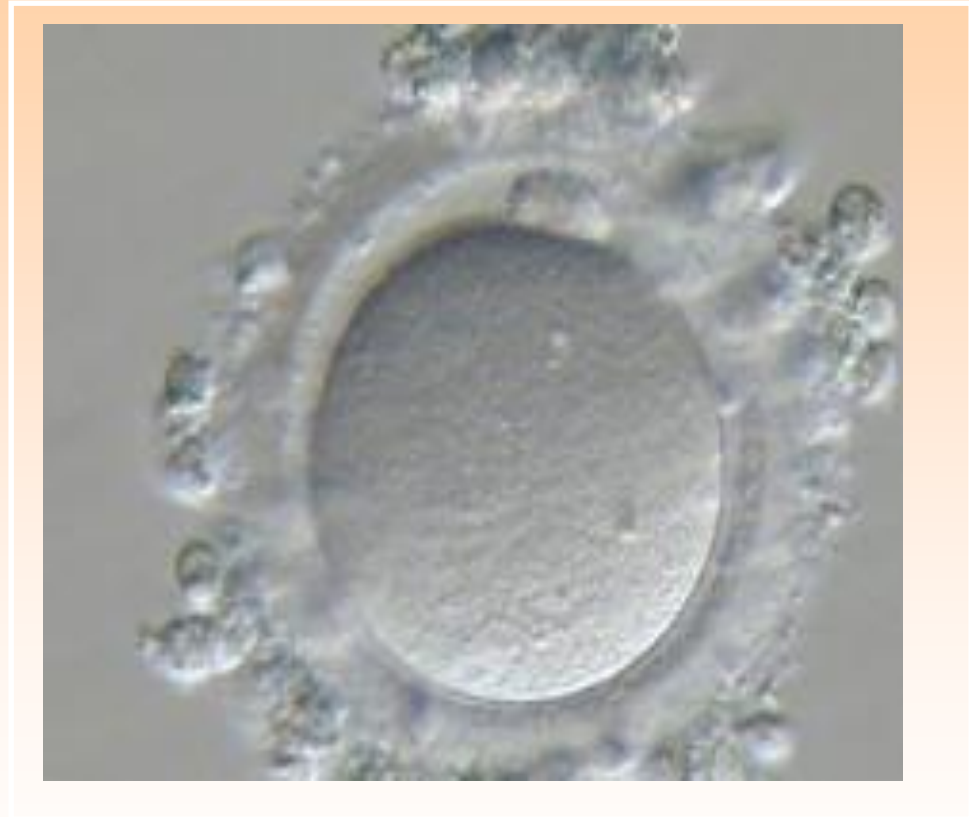


aire medio aire embriones aire medio

Criopreservación de ovocitos

Resultados: (lento)

- *Tasa de sobrevivida*
47%
- *Tasa de fertilización*
52%- 80%
- *Tasa de embarazo/ovocito* : **1.5%**



Success rates

TABLE 3

Success rates of selected recently reported series using slow-freeze and vitrification methods.

Author (y; reference no.)	Method	Survival rate, n (%)	Fertilization rate, n (%)	No. of oocytes per pregnancy
Fabbri (2001 [35])	Slow-freeze	796/1,502 (53)	632/796 (79)	94
Chen (2005 [36])	Slow-freeze	119/159 (75)	80/119 (67)	23
Boldt (2006 [46])	Slow-freeze (sodium depleted)	218/361 (60)	134/218 (61)	26
Yoon (2003 [58])	Vitrification	325/474 ^a (68.6)	142/198 (71.7)	79
Kuwayama (2005 [58])	Vitrification	58/64 (91)	52/58 (90)	5

^a Cryopreserved and thawed cumulus–oocyte complexes.

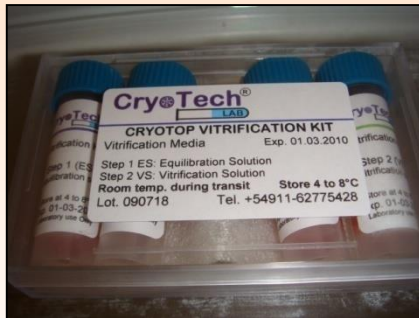
Jain. Oocyte cryopreservation. Fertil Steril 2006.

Vitrificación ovocitaria – Características

- *Simple*
- *Protocolo universal*
- *Crioprotector*
- *Volumen*
- *Dispositivo-dependiente*
- *Habilidad técnica*
- *Cross over inter-especie*
- *Aplicable a diferentes células*
- *Validar eficiencia clínica*

Cryotop Method

- *Kuwayama M Vajta G, Kato O, Leibo SP.*
- *“Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes”*



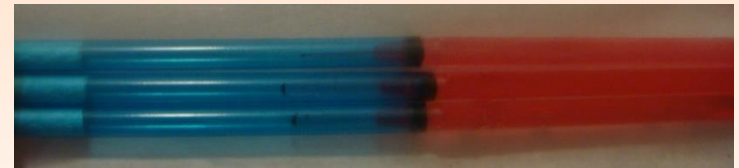
Rbm on line 2005 sep; 11(3): 300-8

Vitrificación

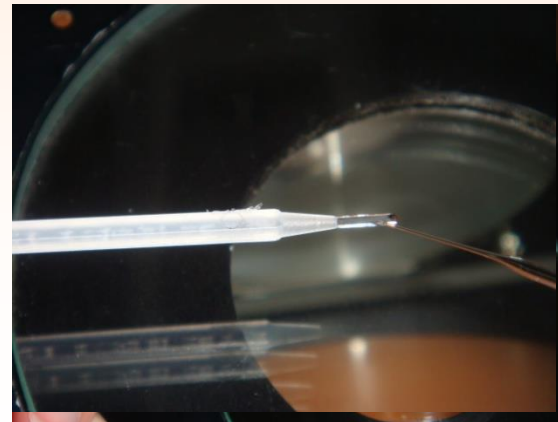
Método Cryotop

La solidificación no se produce por cristalización y formación de hielo, sino por la extrema viscosidad del medio que se enfría a velocidades muy elevadas.

Alta concentración del crioprotector.



La combinación más usada es etilenglicol, DMSO y sacarosa.



Velocidad: -23.000°C / min

Criopreservación

1. Exposición inicial de la célula al crioprotector

- Intracelulares
 - » Glicerol
 - » DMSO
 - » PrOH
 - » Etilenglicol
- Extracelulares
 - » Sacarosa
 - » Ficol

2. Congelamiento hasta temperaturas por debajo de 0°C

3. Almacenamiento (-196° C)

4. Descongelamiento

5. Dilución y remoción de crioprotectores

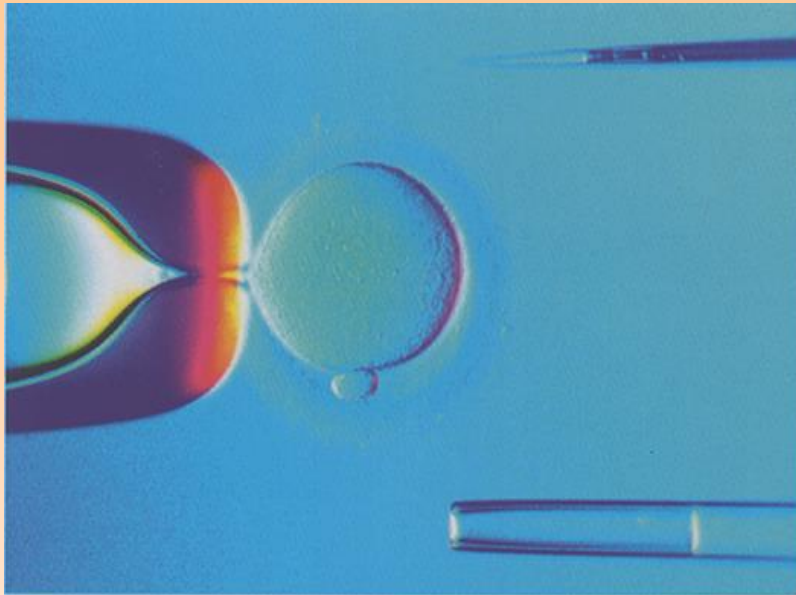
Oocyte vitrification

		<i>PR</i>
• <i>Kuleshova-Trounson (1999)</i>	<i>Etilen glicol</i>	<i>55%</i>
• <i>Yon</i>	<i>Metilenglicol</i>	<i>21%</i>
• <i>Chian</i>	<i>EG +PROH(propilenglicol)</i>	<i>46 %</i>
• <i>Kuwayama criotop (2005)</i>	<i>EG + sucrosa</i>	<i>35%</i>

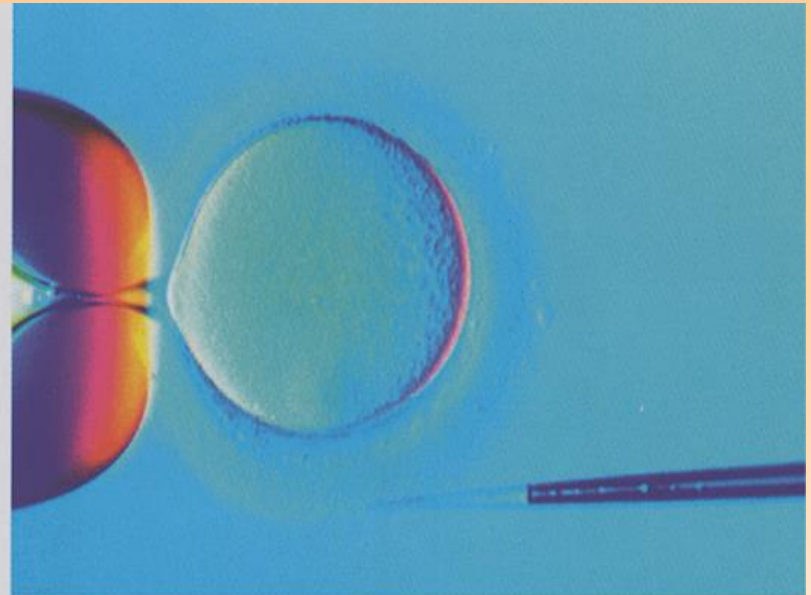
Cryotop method: IVF outcome Egg donation

	<i>%</i>
• <i>Sobrevida</i>	<i>96.7</i>
• <i>Fertilizados</i>	<i>76.3</i>
• <i>Embrio #2</i>	<i>94</i>
• <i>Blasto</i>	<i>48</i>
• <i>n: 23</i>	
• <i>Embarazos</i>	<i>65</i>
• <i>Implantaciones</i>	<i>40</i>
• <i>Abortos</i>	<i>20</i>
• <i>Embarazos evolutivos</i>	<i>47</i>

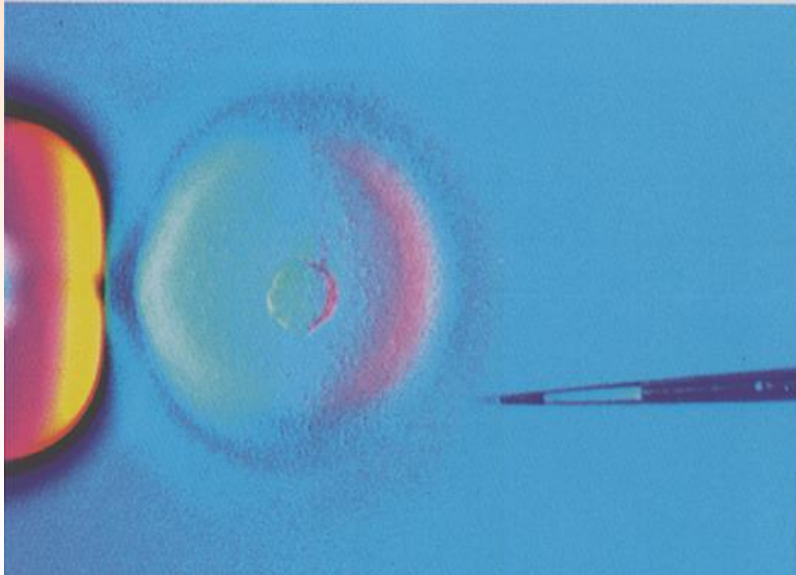
Cobo, Kuwayama Fertil Steril 2008 vol 89



a



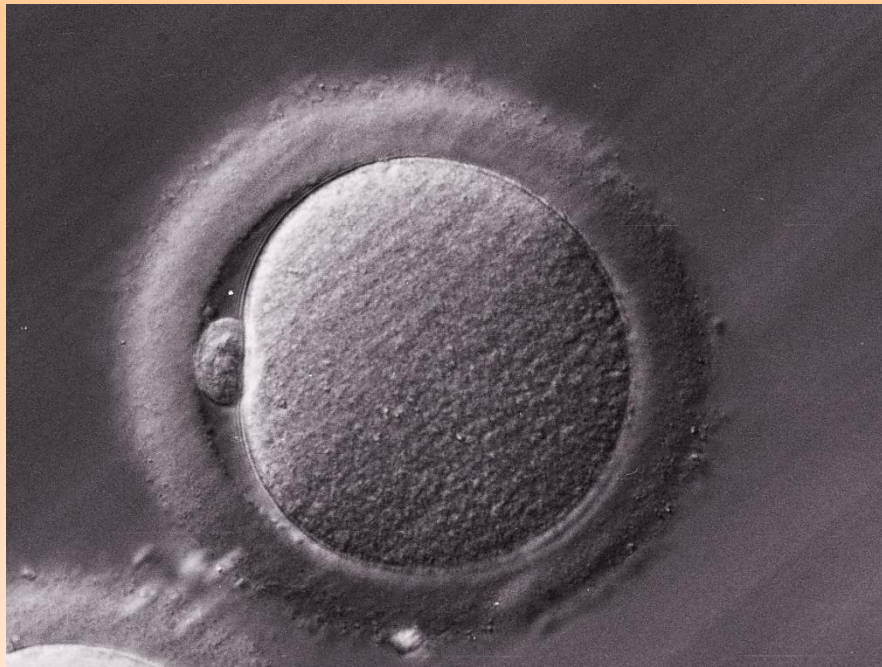
b



Morfología ovocitaria y su repercusión:

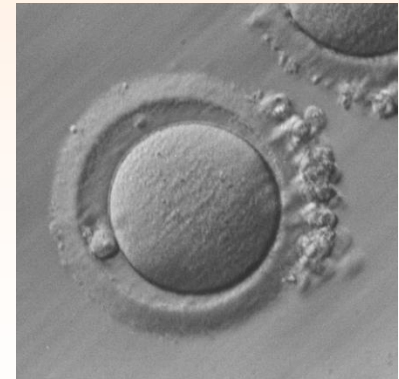
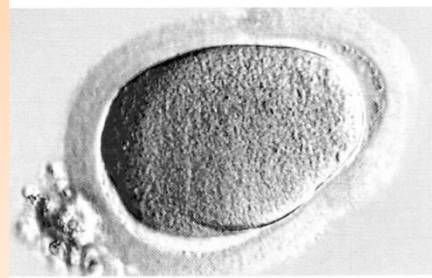
- ICSI: Además de ofrecer resultados exitosos a las parejas infértiles, nos permite la clasificación de las gametas.
- Nos permite conocer la madurez nuclear del ovocito (1° cuerpo polar) y evaluar la morfología ovocitaria.





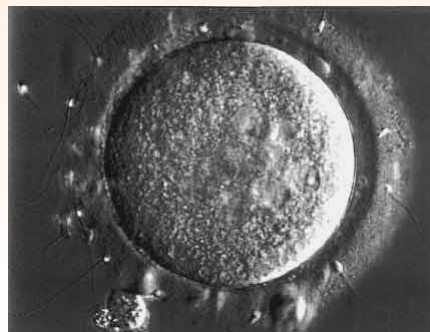
- Tamaño: 110-115 μm .
- Zona pelúcida (ZP) proporcionada, definida y regular (15-20 μm).
- Espacio perivitelino (EPV): es un espacio prácticamente virtual, no observándose ninguna zona más amplia que la que ocupa el CP.
- Forma esférica.
- Citoplasma homogéneo.
- CP único, bien definido y ligeramente aplanado.
- Tamaño total: 150 μm .

Alteraciones morfológicas ovocitarias:



Factores que afectan calidad

- 37 % de anomalías cromosómicas
- *GDF9 Wnt4- WT1-MIS*
- *ZPF / 1, 2, y 3*
- *OCT 4*
- *MATER*



Factores que afectan la sobrevivencia del ovocito

- *Calidad ovocitaria*

- *Elección del crioprotector:*

DMSO

Chen (1986)

PrOH

Porcú (2003)

Pacientes <38años

Ausencia de factor masculino

5 a 10 ovocitos para congelar

900 nacidos

Tasa embarazo 45%

Tasa de implantación 18%

Tasa de aborto 25%

Mecanismos del crioinjuria en ovocitos MII

- **Del huso meiótico:**
Origina aneuploidías, daño producido por crioprotector y/o congelamiento
- **Microfilamentos:**
Responsables de la expulsión del 2do cp, migración de los pronúcleos, citoquinesis.
- **Zona pelúcida:**
Fallas de hatching e implantación
- **Gránulos corticales:**
Fertilización anormal aumentada

Factores que afectan la sobrevivencia del ovocito

- **Calidad** ovocitaria al momento de la colección
- **Crioprotector:**

DMSO	Chen (1986)
PrOH	Porcú (2003)
- **Edad:** Pacientes <38años
- **Número de óvulos M2** ≥ 10 ovocitos para congelar

Congelamiento de ovocitos inmaduros VG

- Se sugirió que podrían ser mas resistentes al congelamiento por:
 - metabolismo relativamente inactivo
 - ausencia de huso meiótico
- Resultados pobres: tasa de maduración, fertilización y clivaje disminuida respecto de ovocitos controles
 - 60 vs 76% 43vs 90% 16 vs 95%
- Reportado 1 embarazo (Tucker)



Vitrificación: indicaciones

- *Aumentar efectividad*
- *Donación de ovocitos*
- *Ausencia zoides – IVF - ICSI*
- *Evitar crio embrionaria*
- *Evitar SHEO*

- *Prevenir POF*
- *Pérdida fertilidad por cáncer*
- *Quimio - radioterapia*



Criopreservación de ovocitos

- **VENTAJAS**

- Colección por protocolos estandarizados
- Buen número de gametas disponibles
- No tiene problemas éticos
- No se requiere de muestra de semen al momento de la colección
- Protocolos de congelamiento y vitrificación parcialmente estandarizados

Criopreservación de ovocitos

- **DESVENTAJAS**

- Altamente sensibles al congelamiento
- Se requiere de tratamiento hormonal
 - contraindicado en cáncer de mama, de endometrio
- Requiere de técnicas de reproducción asistida
- Retrasa tratamientos oncológicos

Table 1. Clinical outcome according to age at vitrification

Survival and clinical outcome in patients aged ≤ 35 years and ≥ 36 years at vitrification									
Age	N patients	N cycles	Survival rate	CPR/cycle	CPR/ET	OPR/cycle	OPR/ET	N live birth/patient	
≤ 35	32	41	257/272 (94.6) ^a	24/41 (58.5) ^a	24/39 (61.5) ^a	21/41 (51.2) ^a	21/39 (53.9) ^a	16/32 (50) ^a	
≥ 36	105	150	750/910 (82.4) ^b	47/150 (31.3) ^b	47/118 (39.8) ^b	27/150 (18.0) ^b	27/118 (22.9) ^b	24/105 (22.9) ^b	
Total	137	191	1007/1182 (85.2)	71/191 (37.1)	71/157 (45.2)	48/191 (25.1)	48/157 (30.5)	40/137 (29.2)	
Survival and clinical outcome according to different groups of age at vitrification									
≤ 29	6	9	59/62 (94.5) ^a	6/9 (66.6) ^a	6/9 (66.6) ^a	6/9 (66.6) ^a	6/9 (66.6) ^a	6/6 (100) ^a	
30–34	20	23	155/161 (96.1) ^a	14/23 (60.9) ^a	14/21 (66.7) ^a	13/23 (56.5) ^a	13/21 (61.9) ^a	9/20 (45) ^b	
35–39	84	127	601/734 (81.8) ^b	48/127 (37.8) ^b	48/112 (42.9) ^b	27/127 (21.3) ^b	27/112 (24.1) ^b	24/84 (28.5) ^b	
≥ 40	27	32	192/225 (85.3) ^b	3/32 (9.8) ^c	3/15 (20) ^c	2/32 (6.3) ^c	2/15 (13.3) ^b	1 (3.7) ^c	
Total	137	191	1007/1182 (85.2)	71/191 (37.1)	71/157 (45.2)	48/191 (25.1)	48/157 (30.5)	40/137 (29.2)	

Reproduced from [13^{***}]. CPR, clinical pregnancy rate; ET, embryo transfer; OPR, ongoing pregnancy rate. Different superscripts in the same column indicate statistical differences ($P < 0.05$). Includes embryo cryo-transfers.

Why all women should freeze their eggs Cobo and Garcí'a-Velasco

Baseline characteristics, COS parameters, IVF data, and overall clinical outcomes.

Parameter	Mean	95% CI
Baseline characteristics		
Patients, n	1,468	NA
No. of cycles (per patient)	2,137 (1.5)	1.4–1.7
Age at FP, y	37.2	36.9–37.3
Patients with previous children, n (%)	18 (1.4)	0.8–2.0
Controlled ovarian stimulation (COS)		
Length of stimulation	10.97 ± 1.7	10.9–11.1
Total FSH dose (IU)	1,308.8 ± 670.8	1,271.8–1,345.8
Total hMG dose (IU)	786.4 ± 705.7	747.5–825.3
E ₂ on day of hCG (pg/mL)	1,511.7 ± 1,172.56	1,447.1–1,576.3
IVF		
No. of retrieved oocytes (per patient)	18,915 (12.9)	12.5–13.3
No. of retrieved oocyte (per cycle)	18,915 (8.9)	8.6–9.2
No. of MII oocytes vitrified (per patient)	14,415 (9.8)	9.5–10.2
No. of MII oocytes vitrified (per cycle)	14,415 (6.7)	6.5–7.1
Patients with no egg retrieval, n (%)	7/2,137 (0.3)	0.1–0.7
COS cycles with no egg retrieval, n (%)	12/2,137 (0.6)	0.1–0.9
Clinical outcomes		
No. of patients returning to use their oocytes	137	NA
Age when returning, y	39.2	39.0–40.1
No. of oocyte warming cycles (per patient)	148 (1.1)	1.0–1.2
No. of MII oocytes warmed (per patient)	1,182 (8.6)	8.3–8.9
Mean storage time, y	2.1	1.9–2.5
Survival rate, n (%)	1,007/1,182 (85.2)	83.2–87.2
ETs/patients at 1st warming, n (%)	108/137 (78.8)	71.7–86.1
ETs/patients (1st + 2nd warming cycles ^a), n (%)	117/137 (85.4)	80.2–92.2
No. of embryos transferred (per patient)	181 (1.5)	14–1.6
Implantation rate, %	35.9	28.9–42.9
CPR/transfer, n (%)	54/117 (46.2)	33.9–52.8
OPR/transfer, n (%)	37/117 (31.6)	20.6–37.9
CPR/patient, n (%)	54/137 (39.4)	29.6–47.8
OPR/patient (%)	37/137 (27.0)	23.1–39.8
CPR/COS cycle, n (%)	54/148 (36.5)	27.1–42.1
OPR/COS cycle, n (%)	37/148 (25)	18.1–31.5
Deliveries	26 ^b	NA
No. of live births	31 ^c	NA

Note: CI = confidence interval; CPR = clinical pregnancy rate; ET = embryo transfer; FP = fertility preservation; MII = metaphase II; OPR = ongoing pregnancy rate.

^a 137 1st warming cycles + 11 2nd or 3rd warming cycles.

^b 11 other pregnancies still ongoing.

^c Three sets of twins.

Cobo. Oocyte vitrification for elective FP. *Fertil Steril* 2016.

Cobo. Oocyte vitrification for elective FP. *Fertil Steril* 2016.

Survival and clinical outcomes according to age at time of vitrification, n (%).

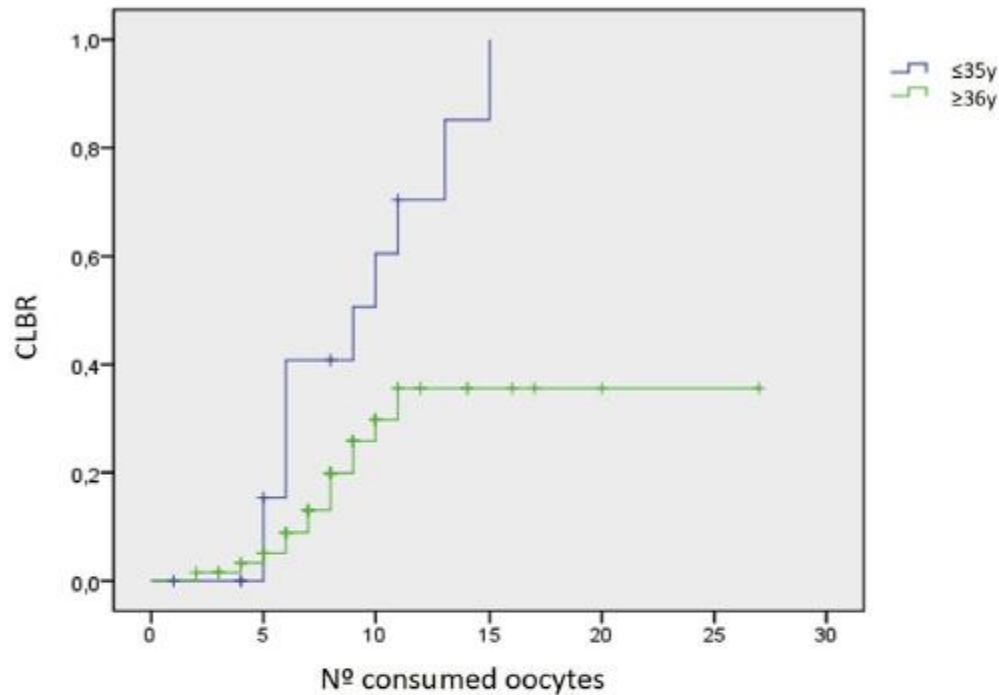
Age, y	Patients, n	Cycles, n	Survival rate, n (%)	CPR/cycle, n (%)	CPR/ET, n (%)	OPR/cycle, n (%)	OPR/ET, n (%)	Live births/patients, n (%)
Survival and clinical outcomes in patients aged ≤ 35 y and ≥ 36 y at vitrification								
≤ 35	32	41	257/272 (94.6) ^a	24/41 (58.5) ^a	24/39 (61.5) ^a	21/41 (51.2) ^a	21/39 (53.9) ^a	16/32 (50) ^a
≥ 36	105	150	750/910 (82.4) ^b	47/150 (31.3) ^b	47/118 (39.8) ^b	27/150 (18.0) ^b	27/118 (22.9) ^b	24/105 (22.9) ^b
Total	137	191	1,007/1,182 (85.2)	71/191 (37.1)	71/157 (45.2)	48/191 (25.1)	48/157 (30.5)	40/137 (29.2)
Survival and clinical outcomes according to different groups of age at vitrification								
≤ 29	6	9	59/62 (94.5) ^a	6/9 (66.6) ^a	6/9 (66.6) ^a	6/9 (66.6) ^a	6/9 (66.6) ^a	6/6 (100) ^a
30–34	20	23	155/161 (96.1) ^a	14/23 (60.9) ^a	14/21 (66.7) ^a	13/23 (56.5) ^a	13/21 (61.9) ^a	9/20 (45) ^b
35–39	84	127	601/734 (81.8) ^b	48/127 (37.8) ^b	48/112 (42.9) ^b	27/127 (21.3) ^b	27/112 (24.1) ^b	24/84 (28.5) ^b
≥ 40	27	32	192/225 (85.3) ^b	3/32 (9.8) ^c	3/15 (20) ^c	2/32 (6.3) ^c	2/15 (13.3) ^b	1 (3.7) ^c
Total	137	191	1,007/1,182 (85.2)	71/191 (37.1)	71/157 (45.2)	48/191 (25.1)	48/157 (30.5)	40/137 (29.2)

Note: Abbreviations as in Table 1.

^{a,b,c} Different superscripts in the same column indicate statistical differences ($P < .05$).

Cobo. Oocyte vitrification for elective FP. *Fertil Steril* 2016.

CLBR according to age (≤ 35 vs ≥ 36) and N° oocytes consumed

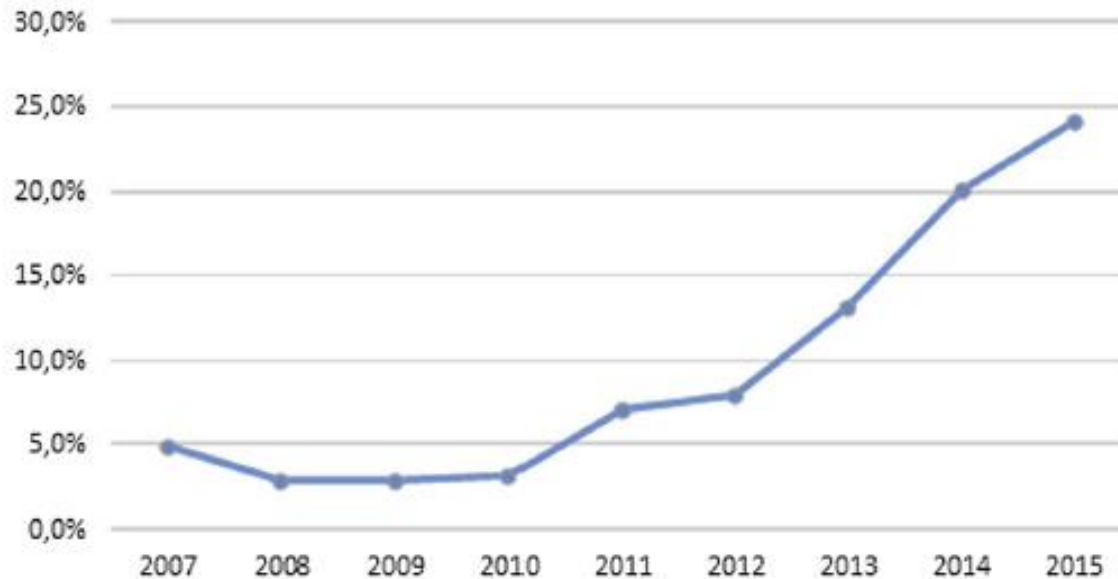


≤ 35 years old		≥ 36 years old	
N°oocytes	CLBR (IC95%)	N°oocytes	CLBR (95% CI)
5	15,4 (-4.2-35.0)	5	5,1 (-0.6-10.7)
8	40,8 (13.2-68.4)	8	19,9 (8.7-31.1)
9	50,6 (31.6-79.6)	9	25,8 (12.7-38.9)
10	60,5 (34.5-89.5)	10	29,7 (15.2-34.2)
15	85,2 (60.5-100)	11	35,6 (18.4-52.8)

Kaplan-Meier plotting of the cumulative live birth rates (CLBR) of at least one baby, depending on the total number of consumed oocytes and categorized by age (≤ 35 y and ≥ 36 y). Overall comparisons: log rank (Mantel-Cox); $P=.003$; Tarone-Ware; $P=.011$. The table shows the CLBRs and 95% confidence intervals (CI) when 5-15 oocytes were consumed, according to age.

Cobo. Oocyte vitrification for elective FP. Fertil Steril 2016.

Trends of elective FP



Year	Total vit. Cycles*	EFP due to age	EFP due to medical no oncological	Total EFP	%EFP**
2007	570	25	3	28	4.9
2008	2.057	39	20	59	2.9
2009	2.739	58	22	80	2.9
2010	3.178	90	13	103	3.2
2011	3.500	230	16	246	7.0
2012	3.395	245	27	272	8.0
2013	3.129	347	66	413	13.2
2014	3.234	569	82	651	20.1
2015	1.179	262	23	285	24.2
Total	22.981	1.865	272	2.137	9.3

Elective fertility preservation (FP) trends regarding the total number of oocyte vitrifications (vit.) for other reasons in our group. The plotting shows the total number of elective FP (EFP) cycles. *All of the metaphase II (MII) vitrification cycles at all clinics involved. **Percentage of EFP cycles among the total MII vitrification cycles.

Results: the euploid embryo

Age	Pregnancy rate	<u>Aneuploidy</u>
Menor 35	30%	<u>50%</u>
Mayor 40	< 6%	<u>80%</u>

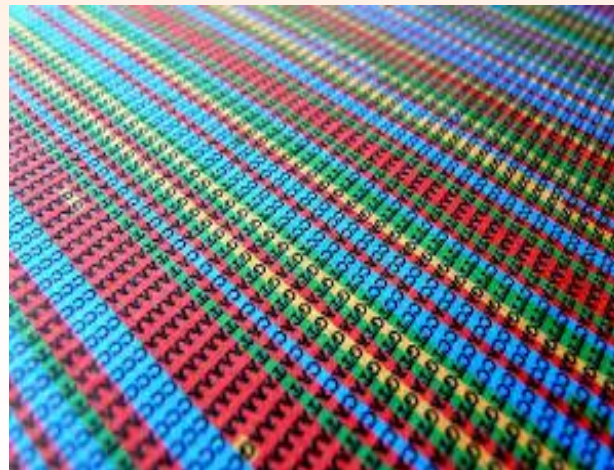
Egg aneuploidy	Sperm aneuploidy
20 -50%	0.5 – 1%

[Munné S](#) Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. [Curr Genomics](#). 2012 Sep;13(6):463-70.

How to select competent embryo?



PGS technology



- CGH array
- CGH and GCH
- hibridization

- NGS
- Quantitative /qualit method
- Flow cell
- Digital not analogic data
- Copied massively
- Large scale sequency in paralelle fashion

- Analisis:
- DNA metilation
- DNA protein interaction
- Microbiological diversity in human and enviroment

Preimplantation screening

PGS

- Maternal age > 36
- recurrent miscarriage
- *Implantation failure*



Selection of euploid embryo

- NGS



The euploid embryo

Age	Pregnancy rate	<u>Aneuploidy</u>
Menor 35	30%	<u>50%</u>
Mayor 40	< 6%	<u>80%</u>

Egg aneuploidy	Sperm aneuploidy
20 -50%	0.5 – 1%

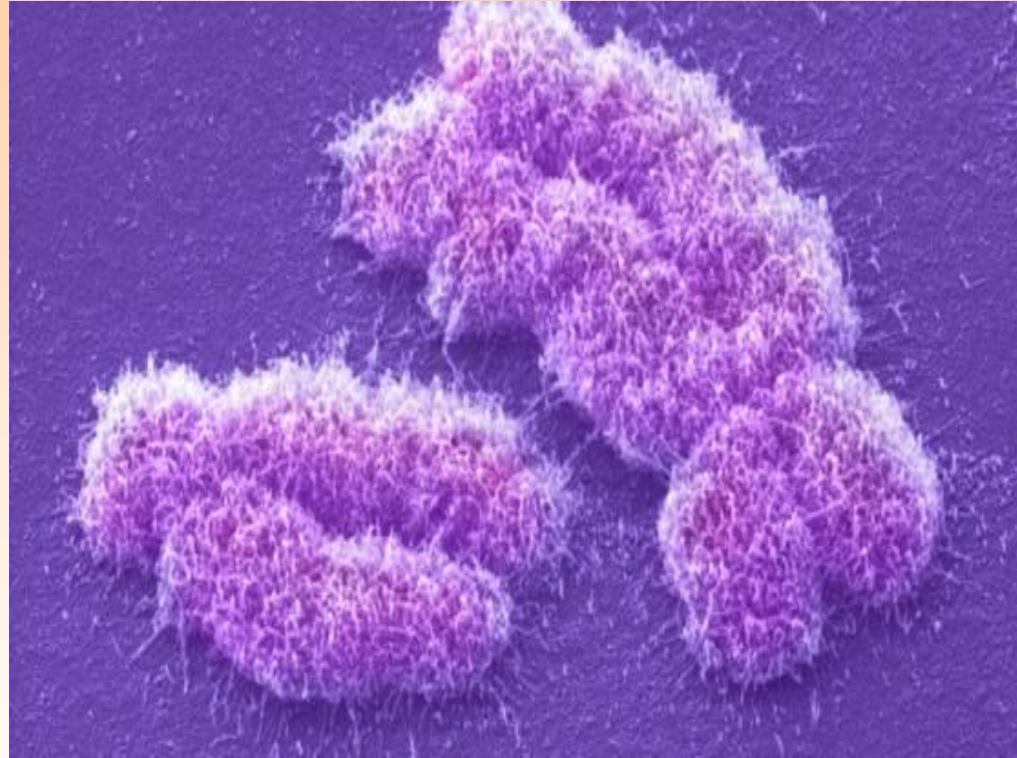
Euploid embryo selection: CGH

Age	%
Donor	62
< 35	46
35 - 37	40
38 - 40	30
40 - 42	16
> 42	10.7

- Aneuploidia
- Translocation
- Deletion
- Duplication

Limitation:

- Haploidy
- Poliploidy



[Munné S](#) Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. [Curr Genomics](#). 2012 Sep;13(6):463-70.

Comentarios finales –

- Prevención- antecedentes
- Detectar poblaciones de riesgo POF
- Uso de bio – marcadores a edad más temprana
- Genómica
- Patología autoinmune
- Preservación a edades mas tempranas



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN MEDICINA REPRODUCTIVA

Dra. Stella Lancuba
Dra. Marisa Giménez
Lic. Constanza Branzini
Dra. Mariana Lopez
Dr. Guillermo Wolfenson
Dr. Federico Ferraris
Dr. Ismael Debaisi
Lic. Ma. Eugenia Solari
Inst. Ma. Eugenia Almada

Av. FOREST 1166
Ciudad de Buenos Aires
www.cimer.com

