

Implicaciones estructurales y reproductivas de la vitrificación y desvitrificación ovocitaria

Structural and reproductive implications of oocyte vitrification and thawing

Prieto Rodríguez, A¹; Hato Castro, M. T¹; Vallecillo Troncoso, C¹; García del Castillo, S¹; López Villaverde, V¹

¹ Clínica Embryocenter (Sevilla, España).

RESUMEN

La vitrificación es una herramienta fundamental en la reproducción asistida que permite criopreservar embriones y gametos evitando la formación de hielo. La vitrificación de ovocitos ha supuesto un gran avance tecnológico no solamente para tratar pacientes con problemas de fertilidad, sino también como un medio para que la mujer pueda criopreservar sus ovocitos y, por tanto, aumentar las posibilidades de concebir en un futuro. Los notables resultados clínicos en ciclos con ovocitos vitrificados han potenciado el desarrollo y uso de programas de donación, sobre todo a partir de la segunda mitad de la última década, y han conseguido que la vitrificación de ovocitos sea en la actualidad una técnica básica y ampliamente utilizada en la práctica clínica rutinaria. Sin embargo, los científicos expertos en biología y tecnología de la reproducción han publicado que la vitrificación puede tener consecuencias sobre el propio ovocito. De hecho, se ha demostrado que afecta a: la ultraestructura, la zona pelúcida, los niveles de calcio, el huso meiótico y la expresión génica ovocitaria, al igual que parece ser que varios parámetros relacionados con la mitocondria también se ven alterados. En este sentido, sería necesario comparar la competencia y eficiencia de los ovocitos que han sido vitrificados frente a los que se han utilizado en fresco y que, consecuentemente, no han pasado por este procedimiento. Tras analizar varios artículos

Correspondencia: andresprietorguez@gmail.com
SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: fertilidad@editorialmedica.com

que comparan el uso de ambos tipos de ovocitos y que reflejan los resultados en términos embriológicos y obstétricos tales como tasas de supervivencia, fecundación, división, calidad embrionaria en distintos días de desarrollo, tasas de implantación, embarazo en curso y recién nacido vivo, entre otros, es posible afirmar que, en líneas generales, son comparables entre ambos grupos. Asimismo, algunos estudios han demostrado que no existe una mayor incidencia de alteraciones perinatales con la utilización de ovocitos previamente sometidos a vitrificación frente a los frescos.

Palabras Clave: *Ovocito, Vitrificación, Desvitrificación, Fertilidad*

SUMMARY

Vitrification is a fundamental tool in assisted reproduction that allows the cryopreservation of embryos and gametes avoiding the formation of ice. Oocyte vitrification has been a great technological advance not only for treating patients with fertility problems, but also as a means for women to cryopreserve their oocytes and, therefore, increase the chances of conceiving in the future. The remarkable clinical results in cycles with vitrified oocytes have boosted the development and use of donation programs, especially since the second half of the last decade, and have made oocyte vitrification a basic and widely used technique in routine clinical practice. However, scientists expert in reproductive biology and technology have published that vitrification can have consequences on the oocyte itself. In fact, it has been shown to affect: ultrastructure, zona pellucida, calcium levels, meiotic spindle and oocyte gene expression, as well as several parameters related to mitochondria appear to be altered. In this sense, it would be necessary to compare the competence and efficiency of oocytes that have been vitrified versus those that have been used fresh and, consequently, have not undergone this procedure. After analyzing several articles comparing the use of both types of oocytes and reflecting the results in embryological and obstetric terms such as survival rates, fertilization, division, embryo quality at different days of development, implantation rates, pregnancy in progress and live newborn, among others, it is possible to affirm that, in general terms, they are comparable between both groups. Likewise, some studies have shown that there is no greater incidence of perinatal alterations with the use of oocytes previously submitted to vitrification as opposed to fresh ones.

Key Words: *Oocyte, Vitrification, Thawing, Fertility*

1. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de la reproducción asistida y los avances en las técnicas de criopreservación están reconfigurando el panorama terapéutico para dar respuesta a los retos relacionados con la fertilidad.

La criopreservación se define como un procedimiento por el cual las células se colocan en una solución de sales y un compuesto orgánico de bajo peso molecular, se enfrían a temperaturas muy bajas (normalmente -196°C en nitrógeno líquido), se almacenan durante un tiempo y, posteriormente, pueden descongelarse recuperando su función (1). En el campo de la reproducción, la criopreservación se ha vuelto imprescindible ya que, además de semen y embriones, es posible criopreservar gametos femeninos. Entre sus ventajas se incluyen que: no es necesario una pareja masculina o donante de semen, no conlleva preocupaciones éticas, personales o religiosas para su almacenamiento y evita los problemas legales asociados a la criopreservación y transferencia de embriones en caso de que la pareja se separara

(2, 3). No obstante, presenta más dificultades que la congelación de embriones ya que los ovocitos son más susceptibles al daño debido a su gran relación superficie/volumen, a que contienen una gran cantidad de agua y su baja permeabilidad a la misma, lo cual significa que al congelarse, pueden retener agua y, por lo tanto, se cree hielo intracelular, muy dañino para el ovocito (4, 5). Por lo tanto, la utilización de crioprotectores que se incorporen a la célula a la hora de llevar a cabo este procedimiento es fundamental para reducir estas moléculas de agua que pudieran formar dichos cristales (6, 7).

Entendemos por crioprotector cualquier aditivo externo que, al añadirse a las células previo a la congelación, las protege y produce una alta viabilidad celular post-descongelación (8). Éstos además pueden bajar el punto de congelación, de tal modo que la célula tendría más tiempo para deshidratarse y eliminar el agua lentamente (7, 9).

Hoy en día, el método de elección para la preservación tanto de ovocitos como de embriones es la vitrificación, un procedimiento en el que un líquido se solidifica sin que se for-

men cristales, obteniéndose una transición hacia un estado vítreo y un sólido amorfo como resultado (10). La estrategia más viable se basa en aumentar considerablemente la concentración de crioprotectores respecto a la utilizada en la tradicional congelación lenta y aplicar enfriamientos y calentamientos rápidos (estos últimos para la desvitrificación) (11).

Las diferencias más relevantes entre la congelación lenta y la vitrificación son que esta última requiere menor tiempo de realización, una mayor concentración de crioprotectores (CPA), una mayor velocidad de enfriamiento y evita la formación de cristales (12).

En contraposición a la congelación lenta, con la vitrificación se mejoran los resultados reproductivos ya que varios artículos originales, revisiones y metaanálisis publicados no solo han demostrado mejores tasas de supervivencia, fertilización, división, desarrollo embrionario y formación de blastocistos, sino también tasas significativamente mayores de embarazo clínico (13-17).

En relación a la vitrificación ovocitaria, uno de los principales motivos de su uso es la preservación de la fertilidad. Ésta permite a las mujeres la posibilidad de posponer su maternidad por varias razones, aunque dos son las principales: razón social y motivos oncológicos (18).

Como se ha mencionado, el proceso de vitrificación de ovocitos y su posterior desvitrificación tiene unas buenas tasas de supervivencia. De hecho, éstas de media alcanzan alrededor del 90 % (85,2 %-96,8 %) (19-22). Sin embargo, no solamente es importante obtener una alta tasa de supervivencia de los ovocitos criopreservados, sino que también es fundamental garantizar la seguridad de estas técnicas de criobiología (23).

Por consiguiente, los objetivos de este trabajo son los siguientes.

1. Por un lado, estudiar si, a pesar de los buenos resultados del proceso de vitrificación, la técnica en sí afecta a determinadas estructuras subcelulares del ovocito y, consecuentemente, altera al propio ovocito pudiendo repercutir en el posterior desarrollo embrionario. Por este motivo, se analizarán artículos que estudien diversos parámetros biológicos, estructuras, orgánulos y perfiles del ovocito antes y después de ser vitrificado.
2. Por otra parte, se pretende hacer un análisis comparativo entre bibliografía que estudie las diferencias encontradas en ciclos realizados con ovocitos en fresco en contraposición con ciclos que hayan utilizado ovocitos desvitrificados, y analizar tanto las posibles variaciones en las tasas de éxito obtenidas, como otros factores biológicos y/o hipotéticas alteraciones perinatales.

2. METODOLOGÍA

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica principalmente en la base de datos PubMed, aunque ScienceDirect y Scopus fueron también consultadas. Igualmente, se han utilizado libros relacionados con el tema y se han empleado documentos procedentes de sociedades tanto españolas como europeas relacionadas con la reproducción asistida y la fertilidad, tales como la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) o la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE).

La búsqueda se ha dividido en dos secciones atendiendo a los objetivos que se han establecido con anterioridad. De este modo, a continuación, se exponen los criterios de inclusión y exclusión tenidos en cuenta para cada una de las dos secciones del trabajo, así como los algoritmos de búsqueda utilizados.

2.1. Criterios de inclusión y exclusión

2.2. Esquema de búsqueda

2.2.1. Alteraciones ovocitarias debidas a la vitrificación

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Alteraciones ovocitarias debidas a la vitrificación

Si bien es cierto que existen avances en los protocolos de vitrificación, aún no se conoce perfectamente cómo afecta dicha técnica a diferentes estructuras y orgánulos intracelulares del gameto femenino. Sin embargo, como veremos detalladamente en los siguientes apartados, la vitrificación puede suponer variaciones de tipo estructural, subcelular, bioquímico y/o genético sobre el ovocito que podrían, hipotéticamente, alterar su competencia biológica.

3.1.1. Daños ultraestructurales: vacuolización

El daño ultraestructural es considerado uno de los sucesos asociados a la criopreservación. La morfología de los ovocitos es un indicador importante a la hora de predecir la calidad de los mismos y la ausencia, o menor incidencia, de vacuolización en los ovocitos vitrificados podría interpretarse como un marcador de buena calidad ovocitaria (24).

Las vacuolas son orgánulos de tamaño y ubicación variables que solo se observan ocasionalmente en ovocitos sanos, es decir, están casi completamente ausentes en el ovocito maduro humano al describirse una frecuencia estimada en torno al 3,9 %. Se pueden observar con microscopía óptica,

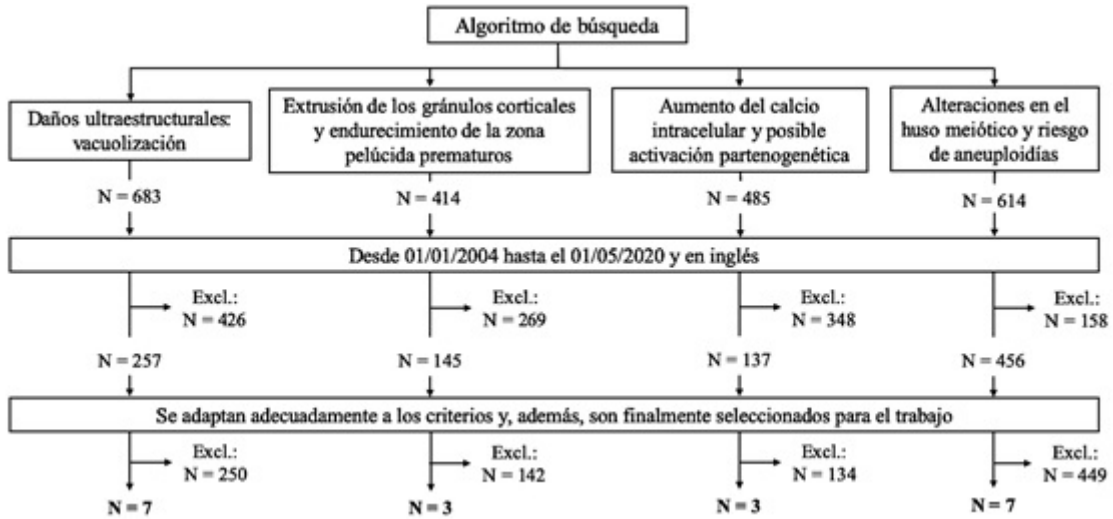
TABLA 1

Resumen de criterios de inclusión y exclusión por apartados

ALTERACIONES OVOCITARIAS		RESULTADOS REPRODUCTIVOS	
C. de inclusión	C. de exclusión	C. de inclusión	C. de exclusión
Artículos sobre la temática en estudio	Artículos con ovocitos criopreservados mediante congelación lenta	Estudios relacionados con el tema y publicados en inglés	Artículos que no utilizan ovocitos humanos sino de modelos animales
Estudios que incluyan las palabras clave para cada subapartado	Estudios con solo ovocitos inmaduros o maduros <i>in vitro</i> o que analicen solamente embriones	Estudios con ovocitos humanos MII	Estudios con congelación lenta, que analicen solo embriones u ovocitos inmaduros o maduros <i>in vitro</i>
Artículos publicados desde el 1 de enero de 2004 hasta el 1 de mayo de 2020 y en inglés	Ensayos publicados fuera de la fecha de búsqueda	Trabajos publicados desde el 1 de enero de 2008 hasta el 1 de mayo de 2020	Ensayos publicados fuera de la fecha de búsqueda
Estudios realizados principalmente en humanos, aunque también algunos en modelos animales	Artículos con doble verificación	Artículos que comparen resultados con ovocitos frescos-vitrificados, propios o donados	Artículos con doble vitrificación

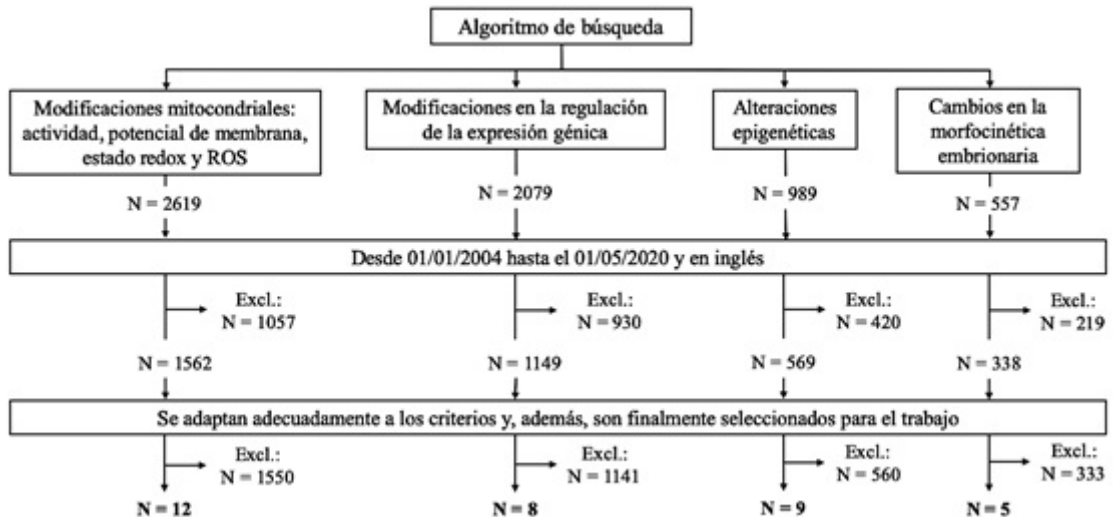
ESQUEMA 1

Algoritmo de búsqueda de bibliografía para daños ultraestructurales, extrusión de gránulos corticales, aumento del calcio intracelular y alteraciones del huso meiótico en el ovocito a csusa de la vitrificación



ESQUEMA 2

Algoritmo de búsqueda de bibliografía para modificaciones mitocondriales, modificaciones en la expresión génica y epigenética y en la morfofocinética embrionaria



2.2.2. Resultados reproductivos: ciclos con ovocitos desvitrificados vs. frescos

ESQUEMA 3

Búsqueda de bibliografía para resultados reproductivos



**Se ha incluido además un documento de la ESHRE y un informe de la SEF a esos 19 artículos, los cuales han sido comentados con diferente profundidad*

aunque se aprecian mejor mediante microscopía electrónica, con la cual se identifican como estructuras redondeadas, aparentemente vacías y rodeadas por una membrana. Su presencia en el ovocito se ha relacionado con la absorción del fluido del espacio perivitelino o con problemas en otros orgánulos como el retículo endoplasmático. Además, la presencia de múltiples vacuolas de diferentes tamaños parece ser un signo de degeneración temprana del ovocito y, por lo tanto, puede afectar al futuro desarrollo del embrión (25, 26). De hecho, un estudio vio que la transferencia de embriones derivados de ovocitos con vacuolas con granulosidad se asoció con altas tasas de aborto y pobres resultados clínicos (26). Sin embargo, otra publicación concluyó que la presencia de una gran vacuola no bloquea totalmente el proceso de fecundación y podría resultar en un desarrollo normal del embrión y una descendencia viable, a pesar de que los autores recomiendan atención prenatal y un seguimiento riguroso (27).

En relación a estos riesgos, algunas publicaciones demostraron que la vitrificación de ovocitos suponía una clara vacuolización (28, 29) y que existen diferencias estadísticamente significativas, aunque moderadas, en el número de vacuolas presentes en ovocitos frescos, vitrificados y criopreservados mediante la técnica de congelación lenta. No obstante, esta vacuolización resultó más pronunciada en los ovocitos sometidos a congelación lenta que en los vitrificados (30).

Es decir, podemos deducir que tanto la presencia como el alcance de la vacuolización dependen del protocolo de criopreservación y que, aunque en menor medida, en comparación con la congelación lenta, la vitrificación provoca una vacuolización. La vacuolización a su vez podría desplazar distintos orgánulos u otras estructuras del ovocito y, por lo tanto, dar lugar en última instancia a una menor competencia y/o un desarrollo embrionario deficiente (24).

3.1.2. Extrusión de los gránulos corticales y endurecimiento de la zona pelúcida prematuros

Los ovocitos maduros en la etapa de MII presentan unos gránulos corticales (GC) bajo el oolema. Tras la fusión de los gametos y la consecuente fertilización, dichos gránulos liberan su contenido enzimático al espacio perivitelino, endureciendo la zona pelúcida (ZP) para evitar la poliespermia y conseguir que un único espermatozoide penetre en el ovocito (12).

Análisis ultraestructurales han demostrado que el número de GC se reduce en los ovocitos desvitrificados y que casi 2/3 del número inicial de GC se liberan de forma no fisiológica produciendo una exocitosis y endurecimiento de la ZP prematuros (Figura 1). Esto podría llevar a un fracaso en la fecundación, aunque se puede corregir si se emplea la ICSI (12, 24, 31).

3.1.3. Aumento del calcio intracelular y posible activación partenogenética

Estrechamente relacionado con la liberación de los GC y el endurecimiento de la ZP se encuentran las alteraciones en el flujo de calcio (Ca^{2+}) citoplasmático en el ovocito, que actúa como un importante segundo mensajero intracelular.

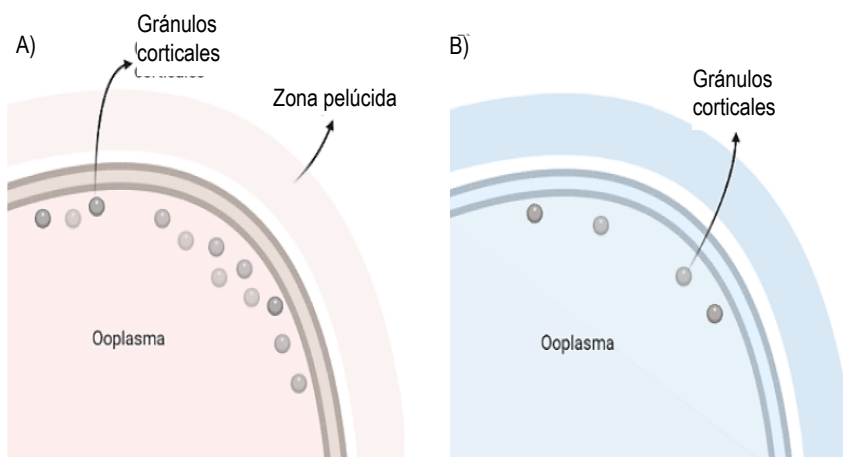
La fusión del espermatozoide con el ovocito hace que se introduzca en este último un factor espermático conocido como fosfolipasa C zeta ($\text{PLC}\zeta$), que será el principal responsable de desencadenar una serie de oscilaciones de baja frecuencia en las concentraciones de calcio intracelular entre la reanudación de la meiosis y la interfase del primer ciclo celular del embrión (32, 33).

Algunos de los cambios que el proceso de vitrificación provoca en la célula, afectan a orgánulos implicados en el mecanismo fisiológico de señalización del Ca^{2+} , como pueden ser las mitocondrias y el retículo endoplasmático liso (REL) (12). También se conoce que el perfil espacio-temporal de estas oscilaciones de calcio en el ovocito (amplitud, duración y frecuencia) son esenciales para la activación del mismo, de modo que si se altera la funcionalidad de estas estructuras y también lo hacen los niveles de Ca^{2+} con ellas, la competencia del ovocito podría verse comprometida. El calcio controla en la activación ovocitaria acontecimientos tempranos y tardíos de vital importancia para el futuro embrión tales como: la exocitosis de GC, la reanudación del ciclo celular, el reclutamiento de ARNm maternos y la capacidad de los blastocistos para implantar y continuar su desarrollo (28, 32, 33).

El perfil de oscilación de calcio en ovocitos humanos vitri-

FIGURA 1

Reducción de GC en ovocitos desvitrificados. En A) encontramos un ovocito fresco con más gránulos corticales en comparación con B), que es un ovocito tras la desvitrificación



ficados difiere del de aquellos que no han sido crioconservados. Por esto, el aumento precoz de calcio intracelular causado principalmente por los CPA es perjudicial y se debería de tener en cuenta (33), pues podría ser relevante a la hora de explicar las causas relacionadas con el posible fracaso en la fecundación (32).

Además, estos cambios tanto en la ZP como en los niveles de calcio pueden producir, junto con la exposición a los CPA, un mayor riesgo de activación partenogenética. Así, por ejemplo, un estudio demostró que al utilizar el CPA propilenglicol en los protocolos de criopreservación se inducía la activación partenogenética. Sin embargo, otros estudios realizados concluyen que la prevalencia de ovocitos activados partenogenéticamente tras la crioconservación no es significativamente mayor en comparación con ovocitos frescos (12, 33).

3.1.4. Alteraciones en el huso meiótico y riesgo de aneuploidías

Otra posible estructura afectada por la vitrificación es el huso meiótico (o huso acromático). Este huso es una estructura compuesta principalmente por microtúbulos de α y β tubulina, y se considera esencial para el proceso de segregación cromosómica que tiene lugar durante la meiosis. Se ha demostrado que estos filamentos son susceptibles a los CPA y al estrés oxidativo, y que la exposición de ovocitos a temperaturas inferiores a 37°C provoca una despolimerización de dichos microtúbulos, que es más rápida cuando la temperatura baja de 0°C. Este hecho puede hacer que se forme el huso meiótico de forma inadecuada y que, a su vez, genere una segregación incorrecta de los cromosomas provocando posibles alteraciones cromosómicas como aneuploidías o poliploidías (12, 33-35).

Sin embargo, otros estudios han demostrado que la vitrificación de ovocitos no aumenta las tasas de aneuploidías ni disminuye el potencial de implantación de blastocistos viables. Sus autores defienden que los embriones procedentes de ovocitos desvitrificados en mujeres menores de 35 años poseen el mismo riesgo de aneuploidías que si fueran frescos (36).

En este sentido, otro estudio reciente que analizó el impacto de la criopreservación de ovocitos en la aneuploidía cromosómica del embrión humano, demostró que no hubo diferencias significativas en el número de embriones aneuploides entre los ovocitos frescos y criopreservados (37).

Con todas estas posibilidades de no disyunción de las cromátidas, errores en la fecundación y posibles divisiones anómalas del embrión, existen preocupaciones con respecto a la estabilidad del huso meiótico durante el proceso de vitrificación (33). Igualmente se ha demostrado que es durante

la descongelación más que en el proceso de congelación, cuando esta estructura puede despolimerizarse (38), aunque también se ha expuesto que el huso puede recuperarse y volver a ensamblarse tras el proceso de crioconservación (39). De hecho, un estudio demostró que el huso acromático de ovocitos en MII vuelve a su configuración normal tras unas 3 horas de incubación después de la descongelación en condiciones estándar (Figura 2), a pesar de que hay factores como la edad que podrían influir en dicha repolimerización (34). Este reensamblaje de los microtúbulos del huso es imprescindible para una correcta alineación y segregación cromosómica tras la fecundación (12).

3.1.5. Modificaciones mitocondriales: actividad, potencial de membrana, estado redox y ROS

Las mitocondrias son unos orgánulos esenciales que forman parte de gran cantidad de actividades celulares, se transmiten principalmente por vía materna y su distribución en el ovocito durante la maduración y segregación de las blastómeras se encuentra muy regulada.

Desempeñan un papel fundamental para la competencia del ovocito ya que producen la energía que permite llevar a cabo todos los procesos celulares de forma coordinada como, por ejemplo, la formación del huso o la apoptosis.

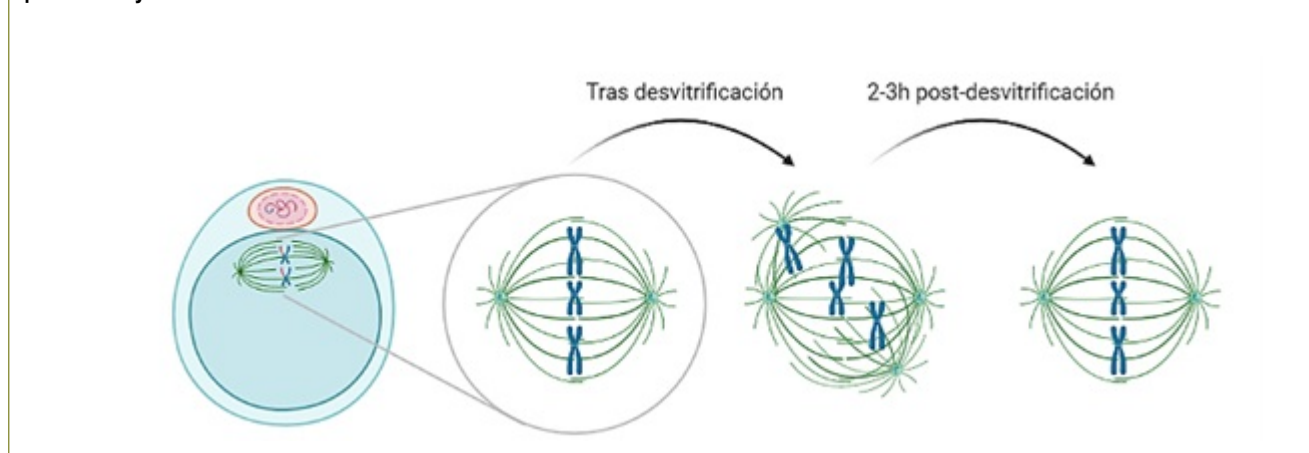
También contribuyen a la homeostasis del Ca^{2+} y del estado redox (reducción-oxidación), siendo importantes en el desarrollo embrionario debido a procedimientos tales como la modulación de la señalización del Ca^{2+} y la producción de: ATP, especies reactivas de oxígeno (ROS).

Otras funciones son las de proporcionar metabolitos intermedios, como pirimidinas y esteroides, y almacenar factores proapoptóticos. Por esto, una disfunción mitocondrial podría comprometer el desarrollo embrionario e, incluso, desencadenar la apoptosis del embrión (40, 41). Algunos estudios realizados han analizado el impacto del proceso de vitrificación sobre ciertos parámetros mitocondriales en el ovocito

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es la base del metabolismo energético en las células y un parámetro bastante sensible al daño celular que está influenciado por los cambios en el medio. Este componente de la mitocondria se puede medir con sondas como el JC-1 gracias a la fluorescencia emitida. Aquellas mitocondrias con una alta diferencia del $\Delta\Psi_m$ son activas y, por tanto, funcionales; mientras que las que presentan una diferencia baja en este $\Delta\Psi_m$ se consideran inactivas (42, 43). Existen discrepancias entre los estudios publicados en torno al $\Delta\Psi_m$ y la distribución mitocondrial con ovocitos que han sido previamente vitrificados. Por un lado, un estudio con ovo-

FIGURA 2

Dinámica del huso meiótico en ovocitos MII antes y después de la vitrificación. Tras ser desvitrificado el huso se desestructura, volviéndose a polimerizar y reestructurarse a las 2-3 horas tras la desvitrificación



citocitos de ratones en MII sometidos a este procedimiento demostró que la vitrificación indujo no solo una distribución mitocondrial alterada, sino también un potencial de membrana mitocondrial disminuido (44). Por otro lado, otro estudio que empleó ovocitos humanos expuso que debido a la vitrificación/desvitrificación, el $\Delta\Psi_m$ de los ovocitos en metafase II podría tener cambios dinámicos temporales en las 2 horas post-desvitrificación, pero se recuperaría tras 4 horas de cultivo (42).

Además, un artículo más reciente defendió un efecto menos perjudicial de la vitrificación tanto sobre la distribución mitocondrial como sobre el $\Delta\Psi_m$ pasadas 2 horas tras la desvitrificación (43) y otra publicación mostró que no existen diferencias en la distribución mitocondrial en ovocitos frescos y criopreservados en diferentes estadios como vesícula germinal (GV) o metafase II (MII). Igualmente, estos investigadores vieron que en los ovocitos en MII el patrón de distribución de las mitocondrias resultó ser liso alrededor del corpúsculo polar con cúmulos agregados en el lado opuesto de dicha estructura (45).

Es importante recordar que el potencial reductor de la mitocondria se forma gracias a las parejas redox que se encuentran en dichos orgánulos y, por tanto, el ATP finalmente producido en la mitocondria deriva de la energía disponible en los intermediarios como el NADH o el FADH₂. Las reacciones de oxidación previas al ciclo de Krebs en la mitocondria producen NADH (la forma reducida del NAD⁺), cuyos electrones de alta energía pasan a la cadena respiratoria o de transporte de electrones. Así, durante el proceso de fosforilación oxidativa los electrones pasan a través de los complejos de esta cadena hasta el aceptor final de elec-

trones (O₂). Esta transferencia se lleva a cabo por medio de reacciones de tipo redox en la mitocondria y provoca que se bombeen H⁺ al exterior de la matriz mitocondrial, produciéndose diferencias en forma de concentración química (variaciones de pH) y distribución de carga ($\Delta\Psi_m$) a través de la membrana mitocondrial interna. El resultado es una fuerza llamada protón-motriz, que se aprovecha para la producción de energía en forma de ATP. La cadena respiratoria mitocondrial es la principal fuente de ROS en las células animales y aquellas células en las que la enzima superóxido dismutasa (SOD), que es la principal fuente de eliminación de ROS, no funcione correctamente pueden morir de forma prematura (46).

Diversos estudios indican que los procesos de crioconservación ovocitaria empleados hoy en día podrían generar estrés oxidativo, principalmente, en forma de radicales libres o ROS. Algunos estudios llevados a cabo con ovocitos humanos señalaron una reducción de los transcritos que codificaban para proteínas que participan en la homeostasis redox (47). En ovocitos porcinos, tras la descongelación, se producía una alteración en la función mitocondrial y un mayor daño en los sistemas antioxidantes endógenos, algo que probablemente indicaría el aumento de los niveles de ROS en los ovocitos vitrificados y que podría ser reducido parcialmente con β -mercaptoetanol (48). Apoyando estos datos, otra publicación reciente afirmaba que la vitrificación de ovocitos en metafase II de ratones indujo una generación anormal de ROS (49). Sin embargo, otro artículo determinó que los niveles de ROS entre ovocitos frescos y vitrificados no presentaron diferencias significativas y se demostró que el metabolismo mitocondrial estaba afectado en los ovocitos

vitrificados por la oxidación de los FAD tras la vitrificación, de modo que tal oxidación del potencial redox mitocondrial se podría reflejar en menores niveles de ATP (43). De hecho, un artículo concluyó que el procedimiento de vitrificación/desvitrificación tenía un efecto negativo a nivel del ATP en los ovocitos humanos, aunque con un tiempo de incubación de 3 horas tras la descongelación, estos niveles se recuperaban parcialmente (50). Además, otra investigación reveló que la relación de fluorescencia FAD/NADH, la cual determinaba los cambios relativos en el estado de oxidación-reducción de la célula, resultó ser mayor en los ovocitos vitrificados que en los ovocitos frescos, independientemente de la edad materna (43).

Otra publicación en la que se usaron ovocitos en MII de ratones afirmó que tras la vitrificación de ovocitos: disminuye el número de copias de ADN mitocondrial (ADNm), disminuye la expresión del gen TFAM que participa en la síntesis mitocondrial y en el mantenimiento y la estabilidad del genoma mitocondrial, se produce una bajada de la actividad enzimática mitocondrial como la de la citocromo C oxidasa (COX, o también conocido como complejo IV de la cadena de transporte electrónico) y aumentan los niveles de ROS (51). Con esto, el consecuente desarrollo embrionario se vería afectado, algo que otros autores demostraron experimentalmente que se podría mejorar con un pretratamiento con docetaxel antes de la vitrificación, pues vieron que aumentaba la expresión tanto de TFAM como de la subunidad I del complejo IV (COX1) (52).

Como vemos no existe consenso sobre las implicaciones de la vitrificación en la actividad mitocondrial del ovocito. Si algo parece claro es que algunos parámetros asociados a este orgánulo, como el potencial redox, pueden verse alterados con la vitrificación y es por ello que actualmente se continúa investigando con nuevos ensayos en esta materia.

3.1.6. Modificaciones en la regulación de la expresión génica

El hipotético menor desarrollo de los ovocitos tras la criopreservación puede ser causado también por una mayor incidencia en la fragmentación del ADN, aunque algunos autores que realizaron ensayos con ovocitos criopreservados mediante vitrificación y congelación lenta publicaron que la integridad de su ADN no se alteró con dichos procesos, siendo la vitrificación más eficaz (12, 53). No obstante, sigue en debate si la vitrificación de los ovocitos en MII podría inducir daños en su correspondiente ADN y en el de los embriones resultantes (49).

Además de los posibles daños que la vitrificación pueda causar en el ADN del gameto femenino, se conoce que pro-

voca cambios en la expresión de sus genes. De hecho, se han realizado relativamente pocos trabajos sobre las implicaciones de la vitrificación en la expresión génica, la estabilidad del ARNm y, por tanto, las modificaciones a nivel transcripcional (33). A pesar de ello, los estudios publicados con ovocitos tanto humanos como de otros mamíferos demostraron que la criopreservación repercutió en el perfil de expresión génica de los ovocitos en metafase II al desregular principalmente genes relacionados con el estrés oxidativo, la apoptosis, el mantenimiento estructural de los cromosomas y el ciclo celular (54).

Algunos estudios que comparan diferentes CPA como, por ejemplo, el DMSO y el etilenglicol han demostrado que el DMSO parece tener un efecto más perjudicial sobre la expresión génica, por lo que es importante el tipo y la concentración de crioprotector empleado para tratar de reducir el daño a nivel molecular (33).

En un estudio llevado a cabo con 25 ovocitos humanos en MII y un 30 % de CPA se evaluó la diferencia de expresión de los ARNm entre los ovocitos vitrificados y los frescos para ocho genes, algunos de los cuales codificaban proteínas fundamentales para el desarrollo del ovocito e importantes funciones. Los resultados demuestran que no se vieron diferencias estadísticamente significativas por lo que se concluyó que los perfiles moleculares de los gametos tras la vitrificación fueron comparables con los frescos (55).

En otro estudio se comparó la expresión génica entre ovocitos frescos, vitrificados y congelados lentamente, observándose que los métodos de criopreservación afectaron negativamente a la expresión génica de los ovocitos humanos en MII, aunque mostraron diferentes perfiles. Así, mientras que la congelación lenta desregulaba la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de la estructura cromosómica y la regulación del ciclo celular, la vitrificación disminuía la expresión de genes asociados con la vía de la ubiquitinación. Sin embargo, tanto la vitrificación como la congelación lenta provocaron en los ovocitos humanos un descenso de transcripciones específicas, es decir, disminuyeron el número de ciertos transcritos y, consecuentemente, provocaron una pérdida de ARNm, sin olvidar que la competencia ovocitaria depende de la carga inicial de ARNm durante la ovogénesis. Así, una reducción de la competencia se consideraría una de las principales razones del fracaso en la fecundación *in vitro* (47).

Otro artículo también determinó que el proceso de criopreservación de los ovocitos se asociaba con una disminución significativa del contenido de ARNm, conservándose solamente el 39,4 % del ARNm cuando se utilizaba la congelación lenta, mientras que tras la vitrificación quedaba el 63,3

% del ARNm. De este modo, a pesar de que los niveles de transcritos resultaron más bajos que con los ovocitos frescos, la vitrificación pudo dar lugar a un nivel de ARNm suficiente para mantener las funciones biológicas requeridas por el ovocito tras la fecundación, principalmente en relación a la estructura del ADN, las mitocondrias y la regulación del ciclo celular (56).

Con todos estos resultados es posible concluir, hasta ahora, que la vitrificación parece alterar los niveles de ARNm en el ovocito, modificando generalmente a la baja los perfiles de expresión génica. En cambio, además de los estudios transcriptómicos, son importantes también los proteómicos y metabolómicos. En este sentido, se ha visto que la vitrificación de ovocitos no altera los perfiles metabolómicos embrionarios, de tal forma que no se alteraría el metabolismo general de los embriones generados a partir de esta clase de ovocitos (57).

3.1.7. Alteraciones epigenéticas

Los datos experimentales publicados sugieren que la criopreservación puede afectar a las marcas epigenéticas en las células de mamíferos. Se conoce que los mecanismos epigenéticos son importantes reguladores de la activación o represión génica que no provocan cambios en la secuencia de ADN. Entre las diferentes marcas epigenéticas destacaremos las modificaciones post-traduccionales de las histonas y la metilación del ADN, siendo esta última la más común en el genoma humano y fundamental en la impronta genómica. Así, durante la maduración ovocitaria y la progresión a través de las distintas etapas de las divisiones meióticas, las histonas de la cromatina de los ovocitos se desacetilan. De hecho, desde que tiene lugar la fecundación hasta que se produce la implantación, el perfil epigenético del embrión cambia dinámicamente. Por lo tanto, el epigenoma es fundamental no solo durante la maduración del ovocito, sino también durante la implantación embrionaria (33, 58).

Diferentes estudios realizados con ovocitos de ratones en MII han dado lugar a resultados contradictorios. Así, por ejemplo, un estudio demostró que la vitrificación aumentó tanto la metilación de la histona H3K9 como la acetilación de la H3K14 (59). Otros artículos publicaron que tras la vitrificación hubo una menor metilación del ADN (60), incluyendo uno de éstos también una menor expresión de las ADN metiltransferasas (DNMTs) (61); mientras que otros autores, a pesar de que vieron una menor expresión del ARNm de una DNMT, no observaron diferencias estadísticamente significativas en los patrones de metilación del ADN (62).

Por otro lado, existen trabajos experimentales con modelos

murinos que indican que el resveratrol podría mejorar los resultados. Se ha visto que podría disminuir la acumulación de γ -H2AX, una fosforilación de la variante de histona H2AX en la serina 139 que es un marcador de daño de doble rotura del ADN que parece estar asociado a ROS (49). Además, el resveratrol restauró la disminución de la expresión de la sirtuina Sirt1 (una desacetilasa de histonas) causada por la vitrificación en ovocitos de ratones, al mismo tiempo que mejoró las metilaciones aberrantes del ADN y modificaciones de acetilación de las histonas (63).

Aunque la mayoría de estos estudios han sido realizados con modelos animales, hay un artículo publicado con ovocitos humanos, el cual pone de manifiesto que, entre ovocitos frescos y vitrificados, no existen diferencias significativas en los patrones globales de metilación del ADN estudiados en los embriones en día 3 de desarrollo (D+3) procedentes de esos ovocitos (64), algo que también se vio al vitrificar directamente embriones humanos (65). Sin embargo, hacen falta más ensayos experimentales para sacar conclusiones y entender claramente los mecanismos que pudieran causar estas alteraciones y analizar si tendrán consecuencias sanitarias a largo plazo.

3.1.8. Cambios en la morfocinética embrionaria

Existen algunos estudios que han analizado las diferencias del desarrollo del embrión derivado de ovocitos frescos y vitrificados. Así, en un artículo la principal diferencia que se observó fue el momento en el que se producía la singamia, que pareció ser más rápido después de la vitrificación, ya que este proceso aceleró la desaparición de pronúcleos e indujo cambios en su estabilidad. Por el contrario, una vez producida la singamia, los embriones se desarrollaron con el mismo patrón (66), al igual que se comentó en otras investigaciones donde vieron que la cinética embrionaria hasta la etapa de cinco células y el número de células en D+3 fueron muy similares y comparables para los embriones derivados de ovocitos frescos y vitrificados (64). Además, ambos grupos de embriones no mostraron grandes diferencias en relación a la tasa de división, número y tamaño de blastómeras y tasa de fragmentación (67).

Por el contrario, en otro trabajo se vio que la primera división mitótica se producía por lo menos una hora más tarde en los ovocitos vitrificados, de tal modo que el desarrollo temprano del embrión derivado de estos ovocitos criopreservados se retrasaba un poco con respecto a los frescos (68). Esto último se confirmó con otra reciente publicación donde gracias a un análisis empleando la tecnología time-lapse para estudiar la morfocinética embrionaria se concluyó que se producía una alteración en el tiempo de desarrollo, más

concretamente un retraso general en la tasa de división y formación de blastocisto en los embriones procedentes de ovocitos donados desvitrificados frente a los frescos de la misma donante (69).

3.2. Resultados reproductivos: ciclos con ovocitos desvitrificados vs. frescos

En la actualidad disponemos de suficiente información para defender la idea de que los resultados reproductivos no se ven afectados por la vitrificación ovocitaria y de que la vitrificación proporciona otras ventajas adicionales, como la posibilidad de enviar ovocitos vitrificados a largas distancias evitando la necesidad del turismo reproductivo, simplificar la logística al no ser necesaria la sincronización de los ciclos de la donante-receptora, o reducir el costo por ciclo de tratamiento al repartir los ovocitos de una donante entre varias receptoras (70). Estas razones explican que (según se deduce de los registros anuales de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) desde 2009 hasta el año 2019, correspondiente a la actividad del 2017), el número de transferencias utilizando ovocitos donados haya crecido de forma exponencial hasta el 2015, año a partir del cual se estabiliza su uso (Figura 3) (71).

Sin embargo, hasta llegar a estas conclusiones, el camino recorrido ha estado marcado por resultados no siempre alentadores y conviene, por esta razón, recordarlo para valorar la importancia del estado actual de conocimientos.

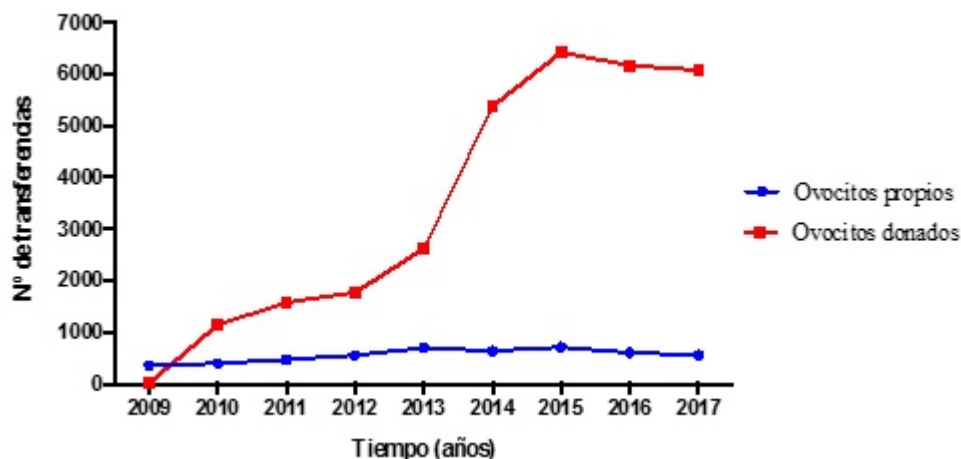
En primer lugar, en el año 2008 se publicó un estudio pros-

pectivo aleatorizado que comparó ovocitos de donantes frescos y vitrificados procedentes del mismo ciclo mediante el método Cryotop. Los siguientes parámetros fueron analizados: tasa de supervivencia, fecundación y división, calidad embrionaria, tasa de implantación y embarazo. Para ello, se requirieron treinta receptoras y otras treinta donantes que aportaron un total de 450 ovocitos maduros, de los que se vitrificaron 231. Tras ser vitrificados y almacenados durante al menos 1 hora, los ovocitos criopreservados se desvitrificaron, mientras que los frescos permanecieron en cultivo durante 2 horas, de tal forma que la ICSI se llevó a cabo simultáneamente en ambos grupos. La tasa de supervivencia tras la desvitrificación fue del 96,7 % y los resultados analizados mostraron que la capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos previamente vitrificados no se vio afectada por el proceso de vitrificación-desvitrificación, pues la fecundación, la división de los embriones, la calidad y los resultados clínicos resultaron ser similares a los obtenidos con los ovocitos frescos. Así, esta publicación defendió hace más de diez años el posible uso de esta tecnología para los programas de donación de ovocitos y establecer bancos (72). Además, este hecho también fue confirmado posteriormente por otros ensayos (73-77).

A diferencia de este estudio donde se analizaron ovocitos de donantes y que, por tanto, procedían de mujeres jóvenes y fértiles, en otro publicado en el año 2010 se incluyeron ovocitos de cuarenta pacientes de edad no superior a 42 años que precisaron TRA y que consiguieron más de 6 ovocitos MII con apariencia normal. El objetivo de este primer

FIGURA 3

Evolución del número de transferencias con ovocitos criopreservados propios y de donantes según los registros de la SEF



ensayo clínico prospectivo aleatorizado con pacientes con problemas de fertilidad fue comparar el rendimiento *in vitro* o desarrollo embrionario de los ovocitos frescos y vitrificados tras la ICSI. Se obtuvieron un total de 244 ovocitos, de los que 124 fueron vitrificados antes de la microinyección y otros 120 fueron inseminados en fresco. La tasa de supervivencia de los ovocitos vitrificados fue del 96,8 %. En relación a la tasa de fecundación no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa y tanto el desarrollo del embrión hasta el día 2 (D+2) como el porcentaje de embriones de alta calidad fue muy similar entre los dos grupos de ovocitos. Para los ciclos con ovocitos vitrificados se obtuvieron quince embarazos clínicos, de los que tres resultaron en abortos espontáneos y doce continuaron más allá de la semana 12 de gestación. Por lo tanto, estos autores indicaron que la vitrificación de ovocitos previa a la ICSI no generó peores resultados en lo que respecta a la fecundación y las tasas de desarrollo embrionario frente al hecho de microinyectar los ovocitos frescos para este tipo de pacientes con trastornos de fertilidad, aunque sería necesario confirmar estos resultados con más estudios y a mayor escala (22).

En ese mismo año, otro artículo comparó los resultados de ovocitos vitrificados y almacenados en bancos de ovocitos para programas de donación versus ovocitos frescos. Este ensayo prospectivo aleatorizado contó con un gran tamaño muestral, incluyéndose 600 receptoras que se dividieron en dos grupos: receptoras de ovocitos vitrificados (con 3286 ovocitos) y de ovocitos frescos (con 3185 ovocitos). La tasa de supervivencia fue de en torno al 92,5 % y la tasa de gestación evolutiva resultó similar para ambos grupos siendo del 41,7 % y 43,7 % para aquellos que emplearon ovocitos frescos y vitrificados, respectivamente. Como conclusión del estudio, se confirmó lo observado en publicaciones anteriores sobre la buena eficacia y no inferioridad de los ovocitos vitrificados frente a los frescos para generar embriones que cuenten con la capacidad de desarrollar buenas tasas de embarazo (74), algo que supone grandes posibilidades en reproducción asistida. Esto último también se vio en otro trabajo donde se publicó que se podían obtener altas tasas acumulativas de embarazo en curso gracias a transferencias de embriones procedentes de ovocitos frescos y crioconservados, siendo la edad de la mujer el factor que influyó significativamente en los resultados (78).

A diferencia de estos tres artículos comentados, donde la transferencia de los embriones se realizó a las 44-48 horas de haber realizado la ICSI (22) o en día 3 de desarrollo (72, 74), en otro publicado en 2011 todas las transferencias se llevaron a cabo en el estadio de blastocisto. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar los resultados de la vitrificación de ovocitos en un programa de donación, evaluando el desarrollo embrionario además de las tasas de fecunda-

ción, implantación y embarazo. De esta forma, se analizó el efecto de la vitrificación sobre la viabilidad de dichos ovocitos desde el momento en el que se produjo la fecundación hasta los días 5 o 6 de desarrollo (D+5 o D+6). Se utilizaron un total de 1098 ovocitos procedentes de 78 donantes que se dividieron en dos grupos de estudio: 786 ovocitos en fresco y 312 ovocitos vitrificados. Estos últimos mostraron una tasa de supervivencia del 89,4 % y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros estudiados. Así, por ejemplo, las tasas de formación de blastocistos para los grupos de estudio (vitrificación) y control (en fresco) fueron de 41,3 y 45,3 %, respectivamente. Como resultado de estos datos, se confirmó que los ovocitos después de ser vitrificados conservaron su capacidad de fecundación y su potencial para llegar a blastocistos de alta calidad de forma similar a la que lo hacen los ovocitos frescos y de ahí que, como se venía viendo en estudios anteriores, se afirmara que la vitrificación se tratara de la mejor alternativa para crear bancos de ovocitos fiables (75). Del mismo, en otro estudio prospectivo controlado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la fecundación, la calidad embrionaria en D+3 o la tasa de formación de blastocistos al emplear ovocitos frescos o vitrificados (79), aunque en otro ensayo también prospectivo, a pesar de que tampoco se vieron diferencias con respecto a esos mismos parámetros, sí que los embriones en etapa de blastocisto de buena calidad fueron mayores en el grupo de ovocitos frescos (31,7 %) en comparación con los del grupo vitrificado (26,1 %). No obstante, se concluye que los ovocitos vitrificados presentan una eficacia clínica similar en comparación con los ovocitos frescos procedentes de la misma paciente (80).

Igualmente, esta última conclusión se confirmó en otros artículos científicos. Por un lado, en un estudio de 2011 se compararon la supervivencia, la fecundación, el desarrollo embrionario temprano y los resultados clínicos de los ovocitos tanto frescos como vitrificados. La supervivencia post-desvitrificación de los ovocitos del banco de ovodonación volvió a ser, como en el resto de artículos consultados, bastante buena (91,4 %), algo que también se observó en los resultados biológicos y clínicos al ser similares para las 77 pacientes sometidas al estudio, que recibieron ovocitos donados frescos (41 de ellas) y vitrificados (las 36 restantes). Consecuentemente, se confirmó de nuevo que ovocitos vitrificados y frescos donados presentaron la misma calidad de embriones, embarazo y potencial de implantación que las donaciones de ovocitos frescos (77).

Otro grupo de clínicos e investigadores llevó a cabo un estudio prospectivo donde utilizaron un total de 2087 ovocitos, de los que vitrificaron 989 que, a su vez, presentaron una tasa de supervivencia del 85,6 %. Los resultados obte-

nidos con los ovocitos vitrificados fueron tan buenos como con los frescos ya que las tasas de fecundación, desarrollo embrionario, embriones de buena calidad, implantación e, incluso, las tasas de recién nacido vivo por transferencia (38,4 % vs. 43,4 % en las receptoras de ovocitos frescos y vitrificados, respectivamente) fueron similares entre ambos grupos. Además, los autores afirmaron que el uso de la vitrificación podría extenderse a otras aplicaciones tales como la acumulación de ovocitos de varias estimulaciones para: pacientes con riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), aquellas que necesitan preservar su fertilidad por diversos motivos o bien por test genético preimplantacional (PGT) (81). Esto último se corroboró gracias a este trabajo donde se establece que, tras las pruebas de PGT previas a la implantación, la acumulación de ovocitos vitrificados es una estrategia para aumentar el número de blastocistos euploides disponibles para la transferencia (82).

La tasa de recién nacido vivo sano fue evaluada en 2013 en un estudio retrospectivo que quiso comparar la eficiencia de la criopreservación de ovocitos mediante los nacimientos de recién nacidos vivos. Se utilizaron ovocitos tanto propios como de donantes y, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en la tasa de recién nacido vivo por embrión transferido entre los grupos frescos y vitrificados, sí que las hubo en la tasa de formación de blastocisto, ya que ésta fue del 64 % para el grupo de ovocitos frescos y del 38,6 % para los vitrificados cuando se usaron ovocitos propios y del 68 % y 40 % para los frescos y vitrificados donados respectivamente. Por lo tanto, se defendió que aunque la vitrificación pudiera afectar negativamente al potencial de formación del blastocisto, en general los resultados de recién nacidos vivos eran similares en ambas situaciones ya que los porcentajes obtenidos fueron del 51,9 % vs. 45,8 % con ovocitos frescos y vitrificados propios, y del 60,3 % vs. 60 % para los frescos y vitrificados donados, respectivamente (83). Sin embargo, en otro trabajo publicado cuatro años más tarde no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de formación de blastocisto entre el grupo de ovocitos frescos (48,8 %) y los vitrificados (51,6 %), al igual que observaron que las tasas de embarazo clínico difirieron en menos de un 2 % entre ambos grupos, por lo que la donación de ovocitos vitrificados del banco produjo tasas de embarazo similares por transferencia de blastocisto cuando se comparaba con el ciclo en fresco (84).

En la Tabla 2 se muestra un resumen de algunas de las publicaciones comentadas con varios parámetros que comparan el uso de ovocitos frescos y vitrificados. Es importante comentar que estos artículos hacen referencia a ciclos con ovocitos donados y, así, pretenden sacar conclusiones para programas de ovodonación, para los que el vitrificar los

ovocitos es fundamental. Asimismo, resaltar que las transferencias en cada uno de ellos fueron llevadas a cabo en diferentes días de desarrollo: D+2 (81), D+3 (72, 74, 77) y D+5 en etapa de blastocisto (75).

Basándose en distintas fuentes de estadísticas nacionales, dos estudios estadounidenses que analizaron datos de 2013, y de 2013 a 2015, concluyeron con resultados contradictorios. El primero, que compara las características y resultados de ciclos de TRA usando ovocitos propios y de donantes criopreservados con ciclos de ovocitos frescos usando datos del Sistema Nacional de Vigilancia de la Tecnología de Reproducción Asistida (NASS) de Estados (105.517 ciclos), concluye que no se observan diferencias entre ambos grupos cuando los resultados se analizan por transferencia en lugar de por ciclo (85). El segundo, que usa datos proporcionados por la Sociedad de Tecnología de la Reproducción Asistida (SART), incluyendo solamente los ciclos con ovocitos de donantes tanto frescos como criopreservados (30.160 ciclos), concluye que la tasa de recién nacido vivo fue significativamente mayor con los ovocitos frescos que con los criopreservados por ciclo iniciado (51,1 % frente a 39,7%) (86).

Hay otros artículos que defienden la idea de que los resultados no se ven afectados por la vitrificación ovocitaria, como un estudio prospectivo realizado en Reino Unido en 2018 (87), o una investigación de un grupo español presentada en la trigésimo quinta reunión anual de la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana (ESHRE) en julio de 2019 en Viena, que ganó el “Premio de Ciencia Clínica” (*Clinical Science Award*) al mejor póster clínico de este congreso. En este último artículo incluso se compararon ovocitos de una misma donante para obtener mayor fiabilidad. En este caso, cuando se analizaron los resultados al inseminar el mismo número de ovocitos tanto frescos como congelados, separando del análisis los ovocitos criopreservados que no sobrevivieron a la desvitrificación, los resultados reproductivos eran comparables. Es decir, se afirma que la vitrificación en sí misma no afectaría a la competencia en el desarrollo ovocitario (88).

Con respecto a los resultados perinatales, en un estudio se evaluaron las complicaciones del embarazo y los defectos congénitos del feto tras la criopreservación y tampoco se observó ningún caso con defectos (89), al igual que en otro trabajo con ovocitos de donantes y ovocitos propios donde tampoco se observó ninguna diferencia significativa (90).

A pesar de todos estos resultados, serían convenientes más estudios con mayores muestras para confirmar estas conclusiones.

En definitiva, lo que vemos es que cuando se analizan los

TABLA 2

Resumen de parámetros embriológicos y obstétricos de diferentes artículos comparando el uso de ovocitos frescos vs. vitrificados procedentes de donantes. O.F.: ovocitos frescos; O.V.: Ovocitos vitrificados; *: n=1

Parámetros (%)	Cobo <i>et al.</i> , 2008		Cobo <i>et al.</i> , 2010		García <i>et al.</i> , 2011		Troboudes <i>et al.</i> , 2011		Solé <i>et al.</i> , 2013	
	O.F.	O.V.	O.F.	O.V.	O.F.	O.V.	O.F.	O.V.	O.F.	O.V.
Tasa de supervivencia	-	96,7	-	92,5	-	89,4	-	91,4	-	85,6
Tasa de fertilización	82,2	76,3	73,3	74,2	87,5	76,1	86,6	84,4	80,7	78,2
Tasa de división D+2	97,8	94,2	96	95,3	98	96,3	95,1	95,8	71	68,2
Embriones de buena calidad en D+2	71,5	84,4	43,8	43,6	84,2	90,8	-	-	54,1	49,8
Tasa de división D+3	84,6	77,6	88,2	87,3	-	-	-	-	-	-
Embriones de buena calidad en D+3	80,5	80,8	60,7	58,4	82,2	90	60,4	64,9	-	-
Tasa de formación de blastocisto	47,5	48,7	-	-	45,3	41,3	-	-	-	-
Embriones de buena calidad en blast.	70	81,1	-	-	77,4	75	-	-	-	-
Tasa de implantación	100*	40,8	40,9	39,9	42,9	43,9	25,6	24,7	33,3	34
Tasa de embarazo clínico/transfer.	100*	65,2	55,6	55,4	60	61,8	48,8	55,6	47,5	53,5
Tasa de embarazo en curso/transfer.	100*	47,8	48,3	49,1	-	-	43,9	47,2	39,4	44,4
Tasa de aborto	0*	20	-	-	5,9	9,5	-	-	19,1	20,8
Tasa de recién nacido vivo/transfer.	-	-	-	-	-	-	41,5	47,2	38,4	43,4

ovocitos que han pasado por el proceso de vitrificación encontramos numerosos estudios que muestran modificaciones a distintos niveles en el ovocito, incluyendo variaciones de tipo ultraestructural, bioquímico y genético.

En cambio, aunque también se han visto cambios morfofocinéticos en los embriones cuando se examinaron los resultados con ovocitos frescos y vitrificados, y algún artículo especifique algún parámetro ligeramente alterado, en líneas generales la mayoría de las publicaciones exponen resultados comparables y reproducibles entre ambos grupos de estudio. Finalmente, a nivel de alteraciones en los neonatos y resultados perinatales parece que no se ve ningún efecto sobre estos provocado por la vitrificación de los ovocitos.

4. CONCLUSIONES

- La vitrificación ovocitaria afecta a la ultraestructura del ovocito y, en cierta medida, provoca una vacuolización, además de una liberación prematura de los gránulos corticales y un endurecimiento anticipado de la zona pelúcida.
- Tanto el perfil de oscilaciones de calcio para la activación ovocitaria como la morfofocinética embrionaria se verían afectados por la vitrificación, produciendo un leve retraso en la tasa de división embrionaria.

- A pesar de que la vitrificación no aumenta la tasa de aneuploidía, el huso meiótico podría verse alterado por el proceso de desvitrificación, aunque esta estructura se puede reensamblar pasadas unas horas.
- Aunque existen resultados dispares, la vitrificación parece tener consecuencias sobre distintos parámetros mitocondriales.
- Si bien existe controversia acerca de si la vitrificación afecta o no al perfil epigenético del ovocito, dicho proceso parece alterar los niveles de ARNm en el ovocito, disminuyendo la expresión génica.
- Los ciclos con ovocitos vitrificados proporcionan, en general, buenos resultados clínicos, eficientes y comparables a aquellos que utilizan ovocitos frescos.
- El uso de ovocitos vitrificados parece no producir alteraciones obstétricas ni perinatales en comparación con los frescos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Leibo, S. P., & Pool, T. B. (2011). The principal variables of cryopreservation: Solutions, temperatures, and rate changes. *Fertility and Sterility*, 96(2), 269–276.
2. Shenfield, F., de Mouzon, J., Scaravelli, G., Kupka, M., Ferraretti, A. P., Prados, F. J., & Goossens, V. (2017). Oocyte and ovarian tis-

- sue cryopreservation in European countries: statutory background, practice, storage and use†. *Human Reproduction Open*, 2017(1), 1–9.
3. **Spoerl, S., Peter, R., & Krackhardt, A. M.** (2016). Biobanking and Cryopreservation of Stem Cells. 951, 67–76.
 4. **Fabrizi, R., Porcu, E., Marsella, T., Rocchetta, G., Venturoli, S., & Flamigni, C.** (2001). Human oocyte cryopreservation: New perspectives regarding oocyte survival. *Human Reproduction*, 16(3), 411–416.
 5. **Paynter, S. J.** (2005). A rational approach to oocyte cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online*, 10(5), 578–586.
 6. **Hunt, C. J.** (2017). Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1590).
 7. **Liebermann, J., Dietl, J., Vanderswalmen, P., & Tucker, M. J.** (2003). Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? *Reproductive BioMedicine Online*, 7(6), 623–633.
 8. **Rajan, R., & Matsumura, K.** (2018). Development and application of cryoprotectants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1081, 339–354.
 9. **Bhattacharya, S.** (2018). Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*.
 10. **Arav, A., & Natan, Y.** (2019). The Near Future of Vitrification of Oocytes and Embryos: Looking into Past Experience and Planning into the Future. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(3), 182–186.
 11. **Pollack, M. G.** (2011). From a backup technology to a strategy-outlining approach: the success story of cryopreservation. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.*, 11(4), 437–452.
 12. **Iussig, B., Maggiulli, R., Fabozzi, G., Bertelle, S., Vaiarelli, A., Ciomadomo, D., Rienzi, L.** (2019). A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 98(5), 550–558.
 13. **Cao, Y. X., Xing, Q., Li, L., Cong, L., Zhang, Z. G., Wei, Z. L., & Zhou, P.** (2009). Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertility and Sterility*, 92(4), 1306–1311.
 14. **Edgar, D. H., & Gook, D. A.** (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 18(5), 536–554.
 15. **Levi-Setti, P. E., Porcu, E., Patrizio, P., Vigilano, V., de Luca, R., d' Aloja, P., Scaravelli, G.** (2014). Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007–2011. *Fertility and Sterility*, 102(1), 90–95.
 16. **Rienzi, L., Gracia, C., Maggiulli, R., LaBarbera, A. R., Kaser, D. J., Ubaldi, F. M., Racowsky, C.** (2017). Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human Reproduction Update*, 23(2), 139–155.
 17. **Smith, G. D., Serafini, P. C., Fioravanti, J., Yadid, I., Coslovsky, M., Hassun, P., Motta, E. L.** (2010). Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertility and Sterility*, 94(6), 2088–2095.
 18. **Cobo, A., García-Velasco, J., Domingo, J., Pellicer, A., & Remohí, J.** (2018). Elective and Onco-fertility preservation: Factors related to IVF outcomes. *Human Reproduction*, 33(12), 1–10.
 19. **Cobo, A., García-Velasco, J. A., Coello, A., Domingo, J., Pellicer, A., & Remohí, J.** (2016). Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertility and Sterility*, 105(3), 755–764.
 20. **De Munck, N., Verheyen, G., Van Landuyt, L., Stoop, D., & Van De Velde, H.** (2013). Survival and post-warming in vitro competence of human oocytes after high security closed system vitrification. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(3), 361–369.
 21. **Potdar, N., Gelbaya, T. A., & Nardo, L. G.** (2014). Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 29(2), 159–176.
 22. **Rienzi, L., Romano, S., Albricci, L., Maggiulli, R., Capalbo, A., Baroni, E., Ubaldi, F.** (2010). Embryo development of fresh “versus” vitrified metaphase II oocytes after ICSI: A prospective randomized sibling-oocyte study. *Human Reproduction*, 25(1), 66–73.
 23. **Yurchuk, T., Petrushko, M., & Fuller, B.** (2018). Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars. *Early Human Development*, 126, 6–9.
 24. **Khalili, M. A., Maione, M., Palmerini, M. G., Bianchi, S., Macchiarelli, G., & Nottola, S. A.** (2012). Ultrastructure of human mature oocytes after vitrification. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 56(3).
 25. **Nottola, S., Macchiarelli, G., & Familiari, G.** (2014). Fine Structural Markers of Human Oocyte Quality in Assisted Reproduction. *Austin Journal of Reproductive Medicine & Infertility*, 1(1), 1–5.
 26. **Sousa, M., Cunha, M., Silva, J., Oliveira, E., Pinho, M. J., Almeida, C., Barros, A.** (2016). Ultrastructural and cytogenetic analyses of mature human oocyte dysmorphisms with respect to clinical outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(8), 1041–1057.
 27. **Fancsovsits, P., Murber, Á., Gilán, Z. T., Rigó, J., & Urbancsek, J.** (2011). Human oocytes containing large cytoplasmic vacuoles can result in pregnancy and viable offspring. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(4), 513–516.
 28. **Gualtieri, R., Mollo, V., Barbato, V., Fiorentino, I., Iaccarino, M., & Talevi, R.** (2011). Ultrastructure and intracellular calcium response during activation in vitrified and slow-frozen human oocytes. *Human Reproduction*, 26(9), 2452–2460.
 29. **Palmerini, M. G., Antinori, M., Maione, M., Cerusico, F., Versaci, C., Nottola, S. A., Antinori, S.** (2014). Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification. *Journal of Reproduction and Development*, 60(6), 411–420.
 30. **Bianchi, V., Macchiarelli, G., Borini, A., Lappi, M., Cecconi, S., Miglietta, S., Nottola, S. A.** (2014). Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with a closed device: A comparative analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1–13.
 31. **Nottola, S. A., Cotichio, G., Sciajno, R., Gambardella, A., Maione, M., Scaravelli, G., Borini, A.** (2009). Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. *Reproductive BioMedicine Online*, 19(SUPPL. 3), 17–27.
 32. **Nikiforaki, D., Vanden Meerschaut, F., Qian, C., De Croo, I., Lu, Y., Deroo, T., De Sutter, P.** (2014). Oocyte cryopreservation and in vitro culture affect calcium signalling during human fertilization. *Human Reproduction*, 29(1), 29–40.
 33. **Tucker, M. J., & Liebermann, J.** (2015). Vitrification in Assisted Reproduction. In CRC Press.
 34. **Cobo, A., Pérez, S., de los Santos, M. J., Zulategui, J., Domingo, J., & Remohí, J.** (2008). Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(3), 350–359.
 35. **Larman, M. G., Minasi, M. G., Rienzi, L., & Gardner, D. K.** (2007). Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(6), 692–700.
 36. **Forman, E. J., Li, X., Ferry, K. M., Scott, K., Treff, N. R., & Scott, R. T.** (2012). 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. *Fertility and Sterility*, 98(3), 644–649.

37. **Buderatska, N., Gontar, J., Ilyin, I., Lavrinenko, S., & Petrushko, M.** (2020). Does human oocyte cryopreservation affect equally on embryo chromosome aneuploidy? *Cryobiology*, (March), 2–5.
38. **Rienzi, L., Martinez, F., Ubaldi, F., Minasi, M. G., Iacobelli, M., Tesarik, J., & Greco, E.** (2004). Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Human Reproduction*, 19(3), 655–659.
39. **Tamura, A. N., Huang, T. T. F., & Marikawa, Y.** (2013). Impact of Vitrification on the Meiotic Spindle and Components of the Microtubule-Organizing Center in Mouse Mature Oocytes. *Biology of Reproduction*, 89(5), 1–10.
40. **Dumollard, R., Duchen, M., & Carroll, J.** (2007). The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, 77(06), 21–49.
41. **Wilding, M., Coppola, G., Dale, B., & Di Matteo, L.** (2009). Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction*, 137(4), 619–624.
42. **Chen, C., Han, S., Liu, W., Wang, Y., & Huang, G.** (2012). Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential in human metaphase II oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(10), 1045–1050.
43. **Nohales-Córcoles, M., Sevillano-Almerich, G., Di Emidio, G., Tafone, C., Cobo, A. C., Dumollard, R., & De Los Santos Molina, M. J.** (2016). Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Human Reproduction*, 31(8), 1850–1858.
44. **Lei, T., Guo, N., Tan, M. H., & Li, Y. F.** (2014). Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane potential and distribution. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 34(1), 99–102.
45. **Stimpfel, M., Vrtacnik-Bokal, E., & Virant-Klun, I.** (2017). No difference in mitochondrial distribution is observed in human oocytes after cryopreservation. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 296(2), 373–381.
46. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P.** (2015). *Molecular Biology of the Cell*. In Garland Science.
47. **Monzo, C., Haouzi, D., Roman, K., Assou, S., Dechaud, H., & Hamamah, S.** (2012). Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Human Reproduction*, 27(7), 2160–2168.
48. **Gupta, M. K., Uhm, S. J., & Lee, H. T.** (2010). Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2602–2607.
49. **Chang, H., Chen, H., Zhang, L., Wang, Y., Xie, X., Zhang, Y., & Quan, F.** (2019). Effect of oocyte vitrification on DNA damage in metaphase II oocytes and the resulting preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 86(11), 1603–1614.
50. **Manipalviratn, S., Tong, Z. Bin, Stegmann, B., Widra, E., Carter, J., & Decherney, A.** (2011). Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration. *Fertility and Sterility*, 95(5), 1839–1841.
51. **Amoushahi, M., Salehnia, M., & Mowla, S. J.** (2017). Vitrification of mouse MII oocyte decreases the mitochondrial DNA copy number, TFAM gene expression and mitochondrial enzyme activity. *Journal of Reproduction and Infertility*, 18(4), 343–351.
52. **Dehghani, N., Dianatpour, M., Hosseini, S. E., Khodabandeh, Z., & Daneshpazhouh, H.** (2019). Overexpression of mitochondrial genes (Mitochondrial transcription factor A and cytochrome c oxidase subunit 1) in mouse metaphase II oocytes following vitrification via cryotop. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 44(5), 406–414.
53. **Martínez-Burgos, M., Herrero, L., Megías, D., Salvanes, R., Montoya, M. C., Cobo, A. C., & García-Velasco, J. A.** (2011). Vitrification versus slow freezing of oocytes: Effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertility and Sterility*, 95(1), 374–377.
54. **Stigliani, S., Moretti, S., Anserini, P., Casciano, I., Venturini, P. L., & Scaruffi, P.** (2015). Storage time does not modify the gene expression profile of cryopreserved human metaphase II oocytes. *Human Reproduction*, 30(11), 2519–2526.
55. **Di Pietro, C., Vento, M., Guglielmino, M. R., Borz, P., Santonocito, M., Ragusa, M., Purrello, M.** (2010). Molecular profiling of human oocytes after vitrification strongly suggests that they are biologically comparable with freshly isolated gametes. *Fertility and Sterility*, 94(7), 2804–2807.
56. **Chamayou, S., Bonaventura, G., Alecci, C., Tibullo, D., Di Raimondo, F., Guglielmino, A., & Barcellona, M. L.** (2011). Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. *Cryobiology*, 62(2), 130–134.
57. **Dominguez, F., Castello, D., Remohí, J., Simón, C., & Cobo, A.** (2013). Effect of vitrification on human oocytes: A metabolic profiling study. *Fertility and Sterility*, 99(2).
58. **Osman, E., Franasiak, J., & Scott, R.** (2018). Oocyte and Embryo Manipulation and Epigenetics. *Seminars in Reproductive Medicine*, 36(3–4).
59. **Yan, L. Y., Yan, J., Qiao, J., Zhao, P. L., & Liu, P.** (2010). Effects of oocyte vitrification on histone modifications. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(6), 920–925.
60. **Liang, Y., Fu, X. W., Li, J. J., Yuan, D. S., & Zhu, S. E.** (2014). DNA methylation pattern in mouse oocytes and their in vitro fertilized early embryos: Effect of oocyte vitrification. *Zygote*, 22(2), 138–145.
61. **Cheng, K. R., Fu, X. W., Zhang, R. N., Jia, G. X., Hou, Y. P., & Zhu, S. E.** (2014). Effect of oocyte vitrification on deoxyribonucleic acid methylation of H19, Peg3, and Snrpn differentially methylated regions in mouse blastocysts. *Fertility and Sterility*, 102(4), 1183–1190.
62. **Zhao, X. M., Ren, J. J., Du, W. H., Hao, H. S., Wang, D., Qin, T., ... Zhu, H. Bin.** (2013). Effect of vitrification on promoter CpG island methylation patterns and expression levels of DNA methyltransferase 1 α , histone acetyltransferase 1, and deacetylase 1 in metaphase II mouse oocytes. *Fertility and Sterility*, 100(1), 256–261.
63. **Chen, H., Zhang, L., Wang, Z., Chang, H., Xie, X., Fu, L., Quan, F.** (2019). Resveratrol improved the developmental potential of oocytes after vitrification by modifying the epigenetics. *Molecular Reproduction and Development*, 86(7), 862–870.
64. **De Munck, N., Petrusa, L., Verheyen, G., Staessen, C., Vandekelde, Y., Sterckx, J., van de Velde, H.** (2015). Chromosomal meiotic segregation, embryonic developmental kinetics and DNA (hydroxy)methylation analysis consolidate the safety of human oocyte vitrification. *Molecular Human Reproduction*, 21(6), 535–544.
65. **Derakhshan-Horeh, M., Abolhassani, F., Jafarpour, F., Moini, A., Karbalaie, K., Hosseini, S. M., & Nasr-Esfahani, M. H.** (2016). Vitrification at Day3 stage appears not to affect the methylation status of H19/IGF2 differentially methylated region of in vitro produced human blastocysts. *Cryobiology*, 73(2), 168–174.
66. **Chamayou, S., Romano, S., Alecci, C., Storaci, G., Ragolia, C., Palagiano, A., & Guglielmino, A.** (2015). Oocyte vitrification modifies nucleolar remodeling and zygote kinetics—a sibling study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(4), 581–586.
67. **Montjean, D., Geoffroy-Siraudin, C., Gervoise-Boyer, M., Tourame, P., & Boyer, P.** (2015). Morphokinetics analysis of embryos derived from vitrified/warmed oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(11), 1615–1621.
68. **Cobo, A., Coello, A., Remohí, J., Serrano, J., de los Santos, J. M., & Meseguer, M.** (2017). Effect of oocyte vitrification on embryo quality: time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. *Fertility and Sterility*, 108(3), 491–497.

69. De Gheselle, S., De Sutter, P., & Tilleman, K. (2020). In-vitro development of embryos derived from vitrified-warmed oocytes is delayed compared with embryos derived from fresh oocytes: a time-lapse sibling oocyte study. *Reproductive BioMedicine Online*, 40(1), 82–90.
70. Kushnir, V. A., & Gleicher, N. (2016). Fresh versus cryopreserved oocyte donation. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 23(6), 451–457.
71. Sociedad Española de Fertilidad. (2019). Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2017. Registro SEF, 0–48.
72. Cobo, A., Kuwayama, M., Pérez, S., Ruiz, A., Pellicer, A., & Remohí, J. (2008). Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertility and Sterility*, 89(6), 1657–1664.
73. Cobo, A., Garrido, N., Pellicer, A., & Remohí, J. (2015). Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: Report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertility and Sterility*, 104(6), 1426–1434.
74. Cobo, A., Meseguer, M., Remohí, J., & Pellicer, A. (2010). Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: A prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human Reproduction*, 25(9), 2239–2246.
75. García, J. I., Noriega-Portella, L., & Noriega-Hoces, L. (2011). Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Human Reproduction*, 26(4), 782–790.
76. Nagy, Z. P., Chang, C. C., Shapiro, D. B., Bernal, D. P., Elsner, C. W., Mitchell-Leef, D., Kort, H. I. (2009). Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking. *Fertility and Sterility*, 92(2), 520–526.
77. Trokoudes, K. M., Pavlides, C., & Zhang, X. (2011). Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertility and Sterility*, 95(6), 1996–2000.
78. Ubaldi, F., Anniballo, R., Romano, S., Baroni, E., Albricci, L., Colamaria, S., Rienzi, L. (2010). Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Human Reproduction*, 25(5), 1199–1205.
79. Chang, C. C., Elliott, T. A., Wright, G., Shapiro, D. B., Toledo, A. A., & Nagy, Z. P. (2013). Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years. *Fertility and Sterility*, 99(7), 1891–1897.
80. Papatheodorou, A., Vanderzwalmen, P., Panagiotidis, Y., Petousis, S., Gullo, G., Kasapi, E., Prapas, Y. (2016). How does closed system vitrification of human oocytes affect the clinical outcome? A prospective, observational, cohort, noninferiority trial in an oocyte donation program. *Fertility and Sterility*, 106(6), 1348–1355.
81. Solé, M., Santaló, J., Boada, M., Clua, E., Rodríguez, I., Martínez, F., Veiga, A. (2013). How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Human Reproduction*, 28(8), 2087–2092.
82. Chamayou, Sandrine, Sicali, M., Alecci, C., Ragolia, C., Liprino, A., Nibali, D., Guglielmino, A. (2017). The accumulation of vitrified oocytes is a strategy to increase the number of euploid available blastocysts for transfer after preimplantation genetic testing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(4), 479–486.
83. Goldman, K. N., Noyes, N. L., Knopman, J. M., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2013). Oocyte efficiency: Does live birth rate differ when analyzing cryopreserved and fresh oocytes on a per-oocyte basis? *Fertility and Sterility*, 100(3), 712–717.
84. Domingues, T. S., Aquino, A. P., Barros, B., Mazetto, R., Nicolielo, M., Kimati, C. M., Motta, E. L. A. (2017). Egg donation of vitrified oocytes bank produces similar pregnancy rates by blastocyst transfer when compared to fresh cycle. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(11), 1553–1557.
85. Crawford, S., Boulet, S. L., Kawwass, J. F., Jamieson, D. J., & Kissin, D. M. (2017). Cryopreserved oocyte versus fresh oocyte assisted reproductive technology cycles. *Fertility and Sterility*, 107(1), 110–118.
86. Kushnir, V. A., Darmon, S. K., Barad, D. H., & Gleicher, N. (2018). New national outcome data on fresh versus cryopreserved donor oocytes. *Journal of Ovarian Research*, 11(1), 2.
87. Seshadri, S., Saab, W., Exeter, H., Drew, E., Petrie, A., Davies, M., & Serhal, P. (2018). Clinical outcomes of a vitrified donor oocyte programme: A single UK centre experience. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 225, 136–140.
88. Abstracts of the 35th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. (2019). *Human Reproduction*, 34(Suppl 1), i1–i543.
89. Cobo, A., Serra, V., Garrido, N., Olmo, I., Pellicer, A., & Remohí, J. (2014). Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. *Fertility and Sterility*, 102(4), 1006–1015.
90. Anzola, A. B., Pauly, V., Geoffroy-Siraudin, C., Gervoise-Boyer, M. J., Montjean, D., & Boyer, P. (2015). The first 50 live births after autologous oocyte vitrification in France. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(12), 1781–1787.

Los autores de este trabajo declaran que no existe de conflicto de intereses para su publicación.