



Universidad de Oviedo

MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Efecto de la doble vitrificación de embriones en los resultados de FIV



**AUTORA DEL TRABAJO FIN DE
MÁSTER: Carmen Díez Acedo**

**TUTOR:
Abel Gayo Lana**

Junio 2024

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todos aquellos que han hecho posible este trabajo.

A la clínica ERGO por abrirme sus puertas desde el primer día y por hacerme sentir una más. En especial a mi tutor, Abel, por proponerme este estudio, ayudarme, supervisar mi trabajo y aconsejarme durante este tiempo.

A mis amigos, los de siempre y los que conocí este año, por hacer que este curso fuera increíble. A Elena, con quien he vivido y compartido tanto estos últimos meses. Y a Miguel, gracias.

A mi tía Carmen por enseñarme tantas cosas y por ayudarme siempre que lo he necesitado. Y a mi familia, por apoyarme y creer en mí en cada etapa de mi vida.

Muchas gracias a todos.

“La ciencia y la vida cotidiana no pueden y no deben estar separadas”

Rosalind Franklin

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia de la criopreservación de embriones	1
1.2. Fundamento de la vitrificación.....	2
1.2.1. Sistemas abiertos	4
1.2.2. Sistemas semicerrados.....	4
1.2.3. Sistemas cerrados	4
1.3. Aspectos que influyen en la vitrificación y transferencia de embriones.....	5
1.3.1. Colapso del blastocele: afecta a la supervivencia tras calentamiento	5
1.3.2. Hatching asistido: afecta a la implantación después de la vitrificación	7
1.4. Cambios epigenéticos producidos por la vitrificación	9
1.5. ¿Cuándo y en qué estadio vitrificar?	11
1.6. Doble vitrificación de embriones	12
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
3.1. Estrategia de búsqueda en bases de datos	14
3.2. Criterios de inclusión y exclusión	14
3.3. Artículos incluidos en el estudio	15
3.3.1. Doble vitrificación de embriones biopsiados	15
3.3.2. Doble vitrificación en diferentes estadios embrionarios	17
3.3.3. Doble vitrificación de embriones procedentes de ovocitos vitrificados.....	19
3.4. Análisis estadístico	20
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Efecto de la doble vitrificación en embriones biopsiados.....	24
4.2. Efecto de la doble vitrificación en estadio de embrión en los resultados después de un ciclo de fecundación in vitro.....	25
4.3. Efecto de la vitrificación de embriones procedentes de ovocitos vitrificados.	29
5. DISCUSIÓN	31
5.1. ¿Cuál es el efecto de la doble vitrificación en embriones biopsiados?	32
5.2. ¿Cuál es el efecto de la doble vitrificación en estadio de embrión en los resultados después de un ciclo de fecundación in vitro?	33
5.3. ¿Cuál es el efecto de la vitrificación de embriones procedentes de ovocitos vitrificados?.....	35
6. CONCLUSIONES	39
7. REFERENCIAS.....	40

RESUMEN

La criopreservación de embriones ha revolucionado las técnicas de reproducción asistida, ofreciendo oportunidades de uso futuro a los embriones supernumerarios de un ciclo. Inicialmente la congelación lenta era la técnica predominante, sin embargo, los daños que provocaba en el embrión, así como la baja tasa de supervivencia hicieron que se comenzara a desarrollar la técnica de vitrificación. En este caso, se usan mayores velocidades de enfriamiento, así como mayores cantidades de crioprotectores, obteniéndose mejores tasas de desarrollo embrionario. El éxito de la vitrificación se ve influenciado por diferentes factores como puede ser el colapso asistido previo, o el *hatching* asistido posterior. En ocasiones, es necesario realizar una doble vitrificación embrionaria, ya sea porque el embrión es procedente de un ovocito vitrificado, o porque se lleven a cabo dos vitrificaciones en estadio de embrión. Sin embargo, los resultados de este metaanálisis muestran menores tasas de éxito en cuanto al embarazo y recién nacido vivo, así como un aumento en la probabilidad de aborto espontáneo. Por tanto, sería recomendable no realizar una segunda vitrificación en aquellos casos en los que fuera posible. Sin embargo, muchas veces no depende directamente del laboratorio, y es inevitable realizar esta segunda vitrificación, por lo que sería necesario modificar los protocolos o tiempos de exposición de vitrificación, automatizar las técnicas o incorporar inteligencia artificial en futuros desarrollos para mejorar los resultados en reproducción asistida.

Palabras clave: aborto, colapso asistido, doble vitrificación, eclosión asistida, embarazo, recién nacido vivo, supervivencia embrionaria

ABSTRACT

Embryo cryopreservation has revolutionized assisted reproduction techniques, offering opportunities for future use of supernumerary embryos from a cycle. Initially, slow freezing was the predominant technique, however, the damage it caused to the embryo, as well as the low survival rate, led to the development of the vitrification technique. In this case, higher cooling rates were used, as well as higher amounts of cryoprotectants, resulting in better embryo development rates. The success of vitrification is influenced by a number of factors such as pre-assisted collapse or post-assisted hatching. Sometimes it is necessary to perform double embryo vitrification, either because the embryo is derived from a vitrified oocyte, or because two embryo stage vitrifications are carried out. However, the results of this meta-analysis show lower success rates in terms of pregnancy and live births, as well as an increased probability of miscarriage. Therefore, it would be advisable not to carry out a second vitrification, in those cases where it is possible. However, many times it does not depend directly on the laboratory, and it is inevitable to carry out this second vitrification, therefore, it would be necessary to modify the protocols or exposure times of vitrification, automate the techniques or incorporate artificial intelligence in future developments to improve the results in assisted reproduction.

Keywords: abortion, assisted collapse, assisted hatching, double vitrification, embryo survival, pregnancy, live birth rate

Originalidad y calidad del trabajo

Quiero hacer constar que todo el texto y figuras contenidas en este trabajo son obra original mía, excepto aquellos procedentes de otros autores y cuyo origen se cita debidamente.

Fdo. Carmen Díez Acedo

En Oviedo, a 10 de mayo de 2024

Lista de abreviaturas

β-hCG: Hormona gonadotropina coriónica humana

CPAs: Crioprotectores

DGP: Diagnóstico genético preimplantacional

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNMT: DNA metil transferasa

FIV: Fecundación in vitro

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

MCI: Masa celular interna

N₂L: Nitrógeno líquido

PN: Pronúcleos

RHO: Riesgo de hiperestimulación ovárica

RNV: Recién nacido vivo

SEF: Sociedad española de fertilidad

TE: Trofoectodermo

TET: Tet metilcitosina dioxigenasa

ZP: Zona pelúcida

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de la criopreservación de embriones

La criopreservación de embriones ha revolucionado las técnicas de reproducción asistida, ya que permite reducir la tasa de embarazos múltiples y aumentar la tasa acumulada de embarazos; además, es un procedimiento necesario en caso de diagnóstico genético o en caso de contraindicación para transferencia en fresco (Yurchuk *et al.*, 2018). En los inicios, el objetivo principal de la reproducción asistida era la transferencia en fresco de un único embrión, dejando los embriones restantes con destino todavía incierto; sin embargo, gracias al desarrollo de la criobiología, estos embriones restantes podrían ser utilizados en un futuro. Cabe destacar, que la congelación de ovocitos también resultó como una alternativa a la preservación de fertilidad en diferentes situaciones, ya que la congelación de embriones sigue siendo una técnica prohibida en numerosos países (Casciani *et al.*, 2023). El uso de la criopreservación de embriones generó grandes contradicciones morales, éticas y legales (Yurchuk *et al.*, 2018). En 1983 se informó el primer embarazo resultante de la transferencia de un embrión humano criopreservado (Alan Trounson and Linda Mohr, 1983), sin embargo, no fue hasta 1984 cuando se notificó el primer nacido vivo mediante esta técnica (Zeilmaker *et al.*, 1984).

En la actualidad, existen dos métodos de criopreservación (**Tabla 1**): congelación lenta y vitrificación, que se diferencian en la forma de alcanzar la deshidratación celular, paso importante para evitar la formación de cristales de hielo y, con ello, el daño celular (Loutradi *et al.*, 2008). Por una parte, la congelación lenta se lleva a cabo a velocidades de enfriamiento lentas y con una baja concentración de crioprotectores (CPAs), permitiendo un intercambio progresivo entre el interior celular (agua) y el exterior (CPAs). Por otra parte, la vitrificación utiliza altas concentraciones de crioprotectores y altas velocidades de enfriamiento. De esta forma, las células alcanzan un estado vítreo sin la formación de cristales. Sí bien es cierto que la exposición prolongada a elevadas concentraciones de CPAs puede resultar tóxico para las células, por ello, se intenta minimizar esta exposición (Casciani *et al.*, 2023).

Tabla 1. Resumen de las diferencias entre congelación lenta y vitrificación (Elaboración propia).

Congelación lenta	Vitrificación
- Baja concentración CPAs	- Alta concentración CPAs
- Velocidad de enfriamiento baja y controlada	- Velocidad de enfriamiento muy alta
- Formación de cristales de hielo	- No formación de cristales de hielo (estado vítreo)
- Equipamiento específico (congeladores automatizados)	- No equipamiento específico
- Lleva tiempo	- Se lleva a cabo en minutos

Hasta que se desarrolló la técnica de vitrificación de embriones (Trounson *et al.*, 1987), la congelación lenta era el método de criopreservación tanto de ovocitos y espermatozoides, como de embriones. Sin embargo, el elevado volumen de los ovocitos y embriones, así como su forma esférica suponían un problema para la difusión de los CPAs al interior, favoreciendo la creación de cristales de hielo (Lafuente-Funes, 2023). Actualmente, la técnica de criopreservación de embriones por excelencia es la vitrificación, ya que no requiere ni equipos específicos ni mucho tiempo, no produce cristales intracelulares y, por tanto, reduce la probabilidad de causar daño celular y degeneración (Loutradi *et al.*, 2008).

1.2. Fundamento de la vitrificación

El procedimiento de la vitrificación se basa en el enfriamiento y, sobre todo, calentamiento de los embriones a velocidades muy altas ($> 10000^{\circ}\text{C}/\text{min}$), de tal forma que se consiga un estado vítreo en apenas segundos. Se produce de forma tan rápida que las moléculas de agua no son capaces de formar cristales de hielo que puedan dañar la célula (Gallardo *et al.*, 2019). Sin embargo, para que la vitrificación se lleve a cabo a velocidades elevadas, se deben utilizar concentraciones elevadas de CPAs que, como se explicó anteriormente, pueden resultar perjudiciales para el embrión (Casciani *et al.*, 2023). Los CPAs disminuyen la temperatura a la cual se produce la cristalización celular, de esta forma, la célula se encuentra más deshidratada y el gradiente osmótico es menor. Se pueden diferenciar CPAs permeables, capaces de penetrar en la célula como el glicerol

o el dimetilsulfóxido (DMSO), y CPAs no permeables, incapaces de penetrar, promoviendo una rápida deshidratación como la trehalosa o la glucosa.

Recientes estudios intentan implantar un protocolo ultra-rápido de vitrificación, reduciendo el periodo de exposición a estos crioprotectores, obteniendo resultados comparables o mejores al protocolo estandarizado de vitrificación (Gallardo *et al.*, 2019). Igual de importante resulta el tiempo que pasa el embrión fuera del incubador durante el calentamiento favoreciendo su rehidratación, por ello, diferentes estudios se centran en reducir estos tiempos (Manns *et al.*, 2022; Liebermann *et al.*, 2024). Aunque los resultados obtenidos mediante la rehidratación en un solo paso, permitiendo por tanto una rehidratación más rápida, dieron lugar a tasas elevadas de supervivencia de blastocistos, un calentamiento demasiado rápido podría provocar la fractura de la zona pelúcida o dañar el embrión (Liebermann *et al.*, 2024).

Además de los tiempos de exposición, la composición de los medios de vitrificación también es muy importante para los resultados de supervivencia a la misma. Algunos estudios realizados en embriones de ratón afirman que el uso de antioxidantes durante el proceso de criopreservación mejora el posterior desarrollo embrionario. Concretamente, el uso de acetil-L-carnitina, N-acetil-L-cisteína y ácido α -lipoico como antioxidantes reduce el estrés oxidativo generado durante el proceso, lo que conlleva un aumento en el número celular, una reducción de las células apoptóticas y, por tanto, un mejor desarrollo embrionario y fetal (Truong and Gardner, 2020). Sin embargo, serían necesarios más estudios centrados en humanos para comprobar sus efectos.

Tabla 2. Resumen de las diferencias entre sistemas abiertos y cerrados de vitrificación (Elaboración propia).

Sistemas abiertos	Sistemas cerrados
- Velocidades más rápidas	- Velocidades más lentas
- Fácil manipulación	- Difícil manipulación
- Riesgo de contaminación	- Esterilidad
- Adaptar para muestras serológicas	- Ideal para muestras serológicas

Para llevar a cabo la vitrificación se comenzaron a utilizar sistemas abiertos, sin embargo, el contacto directo con el nitrógeno líquido (N_2L) presenta un elevado riesgo de contaminación del embrión (Joaquim *et al.*, 2017). Por esta razón, se desarrollaron sistemas cerrados de criopreservación, que no dejan de ser variantes de los primeros, minimizando ese riesgo de contaminación e infección con otras muestras al evitar el contacto directo con el N_2L (Yurchuk *et al.*, 2018; Casciani *et al.*, 2023). Por tanto, se pueden diferenciar los siguientes tipos de sistemas de vitrificación (**Tabla 2**):

1.2.1. Sistemas abiertos

Los sistemas de vitrificación totalmente abiertos utilizan pajuelas que establecen un contacto directo entre el embrión y el N_2L durante el proceso de enfriamiento. Sin embargo, presentan la ventaja de que las velocidades de enfriamiento y calentamiento son muy elevadas, entre los 10000-20000°C/min (Vajta *et al.*, 2015).

1.2.2. Sistemas semicerrados

En los sistemas semicerrados, aunque no se produce un contacto directo con el N_2L como ocurría en el caso anterior, la presencia de sus vapores es inevitable, existiendo por tanto un posible riesgo de contaminación a causa de estos. Para ello, se coloca la pajuela en una placa metálica situada en el interior del N_2L , dejando que el embrión se vitrifique con los vapores. Con respecto a la velocidad de enfriamiento se ve algo comprometida, sin embargo, la de calentamiento puede alcanzar velocidades idénticas al caso anterior (Vajta *et al.*, 2015).

1.2.3. Sistemas cerrados

Los sistemas cerrados están caracterizados porque el embrión no establece contacto ni con el N_2L ni con sus vapores, minimizando al máximo el riesgo de contaminación. Para ello, se utilizan unas pajuelas especiales que constan de un capuchón con un metal que permite disminuir la temperatura del interior del mismo. Esto se encontrará en el N_2L , el metal será extraído justo antes de introducir la pajuela en el capuchón, posteriormente se termosella la pajuela y se sumerge en el N_2L (Vajta *et al.*, 2015). Por último, las velocidades de enfriamiento y calentamiento disminuyen (Casciani *et al.*, 2023).

Por otra parte, se ha visto que el número de embriones que se vitrifican en cada pajuela puede afectar a su supervivencia después de la desvitrificación (Aizer *et al.*, 2020). Sin embargo, la velocidad de enfriamiento no se ve influenciada por el número de embriones (Ostler *et al.*, 2021). Como el principal objetivo es la transferencia de un único embrión, la vitrificación individual favorecería esta técnica; sin embargo, en el caso de vitrificar dos embriones juntos, uno de ellos debería volver a ser revitrificado en el caso de realizarse la transferencia de único embrión.

1.3. Aspectos que influyen en la vitrificación y transferencia de embriones

Al igual que en todas las técnicas de reproducción asistida, el éxito de la vitrificación se ve influenciado por diferentes factores que afectan en la calidad futura del embrión. El colapso del blastocele previo a la vitrificación, o la eclosión asistida posterior podrían mejorar la supervivencia del embrión, así como los resultados perinatales posteriores a su transferencia.

1.3.1. Colapso del blastocele: afecta a la supervivencia tras calentamiento

El colapso de un blastocisto se basa en contracciones en el blastocele debidas probablemente a la pérdida de los contactos intercelulares en las células del trofoectodermo (TE). Se ha visto que el fenómeno de colapso espontáneo está asociado a un mayor desequilibrio cromosómico y menor probabilidad de supervivencia y desarrollo del embrión (Cimadomo *et al.*, 2022).

Durante el proceso de vitrificación, el blastocele de blastocistos expandidos puede estar asociado a una peor tasa de supervivencia debida a la formación de cristales de hielo. Es por esta razón por la cual algunos autores afirman que realizar un colapso asistido puede mejorar la probabilidad de desarrollo del embrión después de la vitrificación (Kamel-Mohamed *et al.*, 2022); cabe destacar que, durante el proceso de vitrificación, se produce un colapso químico originado por los propios CPAs. Para llevar a cabo el colapso del blastocele de manera artificial se puede realizar mecánicamente con una microaguja, o mediante el uso de un láser (**Figura 1**). Por una parte, la microaguja se introduce entre las células del trofoectodermo hasta el blastocele hasta que se produce el colapso. Y, por otra parte, con el láser se realiza un único pulso en la unión entre las células del trofoectodermo, dejando la masa celular interna (MCI) alejada del foco. Cabe destacar

que la velocidad de colapso puede ser indicativo de un elevado potencial de desarrollo, es por eso por lo que el láser es más recomendable. Además, el uso del láser no requiere de preparación previa al procedimiento, y causa menor daño en el embrión que la microaguja (Darwish and Magdi, 2016; Kamel-Mohamed *et al.*, 2022).

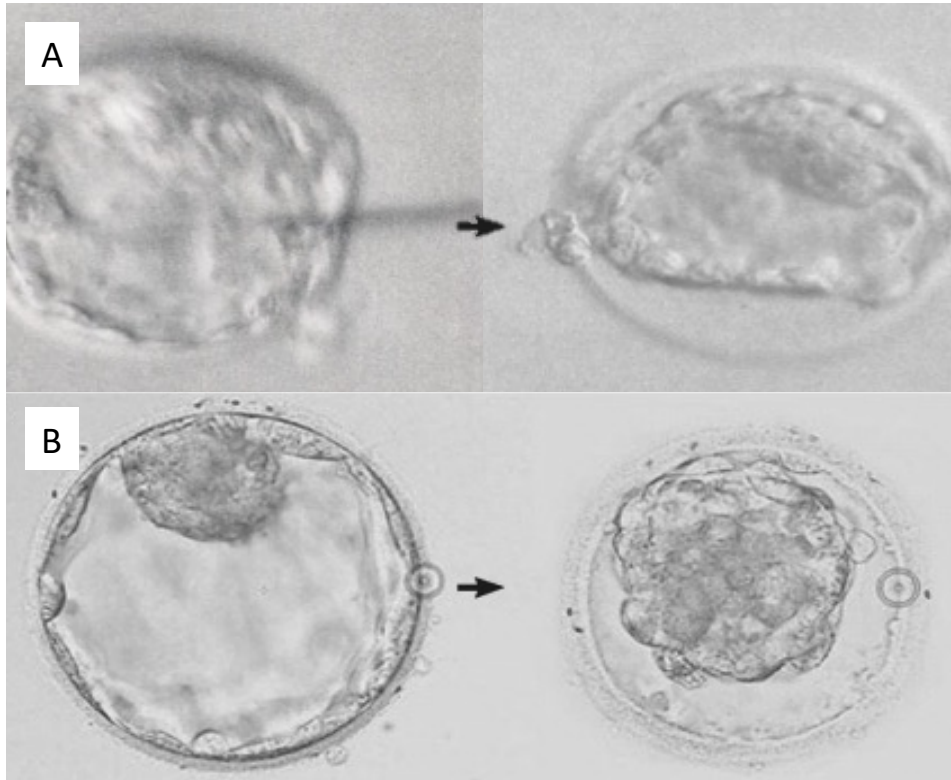


Figura 1. Colapso artificial de un blastocisto. **A.** Mediante el uso de una microaguja. **B.** Mediante un pulso de láser (Imagen cedida por ERGO, 2024).

Un metaanálisis realizado por Boyard *et al.*, (2022) comparó resultados obtenidos después de la vitrificación de blastocistos intactos y colapsados artificialmente. Con respecto a la tasa de embarazo clínico y supervivencia del blastocisto, los que habían sido previamente colapsados mostraban mejores resultados. Sin embargo, la tasa de implantación y de recién nacido vivo (RNV) no parecieron mejorar notablemente. En el año 2022, Kovačič *et al.*, (2022) realizaron otro estudio comparando nuevamente estos factores. Para ello, la mitad de los blastocistos sobrantes de las transferencias en ciclos de fecundación in vitro (FIV) fueron colapsados artificialmente antes de ser vitrificados. Tras la desvitrificación, los blastocistos colapsados mostraron una tasa de supervivencia superior, como ocurría en el estudio de Boyard *et al.*, (2022). Sin embargo, la tasa de recién nacidos vivos, embarazo clínico o aborto espontáneo, aunque también fueron

superiores, no mostraban diferencias significativas. Por último, con respecto a los resultados neonatales, tales como peso al nacer o proporción de sexos, fueron comparables en ambos casos (Kovačič *et al.*, 2022). Por tanto, aunque ambos estudios muestren resultados favorables hacia el colapso artificial de los blastocisto previo a la vitrificación, harían faltan más estudios randomizados y con un mayor número de blastocistos para dar una respuesta concluyente al uso o no de esta técnica (Michailov *et al.*, 2023).

A la vista de los resultados obtenidos en la transferencia de blastocistos colapsados previo a la vitrificación, Brouillet *et al.*, (2024) llevaron a cabo un estudio piloto retrospectivo para evaluar el impacto del colapso artificial en blastocistos destinados a una transferencia en fresco. Sin embargo, no se observó ningún beneficio y, por tanto, los blastocistos se transfieren en fresco sin realizar el colapso, evitando de esta manera un posible daño por uso inadecuado del láser.

1.3.2. *Hatching* asistido: afecta a la implantación después de la vitrificación

La eclosión embrionaria, o *hatching*, es el mecanismo por el cual el embrión sale de la zona pelúcida (ZP) para implantarse en las paredes uterinas, inducido por las expansiones y contracciones del blastocisto que provocan la disminución del grosor de la zona pelúcida (**Figura 2**). Este proceso es crítico para la reproducción, y cualquier obstáculo puede provocar un fallo en la implantación y, por tanto, dificultad para llevar a cabo el embarazo (Avella *et al.*, 2019).

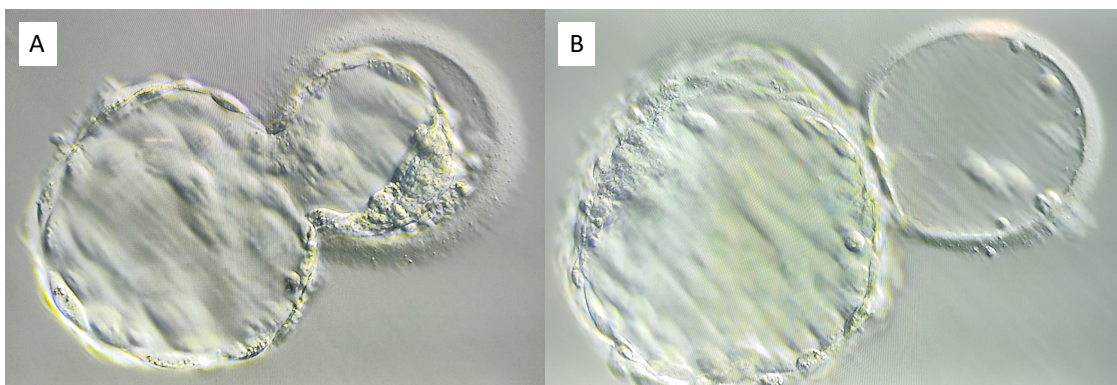


Figura 2. Eclosión embrionaria. **A.** Embrión eclosionando con una ZP muy gorda. **B.** Embrión totalmente eclosionado, fuera de la ZP (Imagen cedida por ERGO, 2024).

Cuando en la práctica clínica nos encontramos con mujeres de edad avanzada, embriones de mala calidad y mal pronóstico o fallos recurrentes de implantación, se opta por llevar a cabo la eclosión asistida o *hatching* asistido (Lu *et al.*, 2019). Esta técnica consiste en provocar la salida del embrión perforando o adelgazando la zona pelúcida de manera artificial, ya sea de forma mecánica (microaguja), química (ácido Tyrodes) o con el uso del láser (Avella *et al.*, 2019; Lacey *et al.*, 2021). El *hatching* asistido también se indica para tratar embriones con ZP gruesa, en caso de fragmentación o después de la vitrificación de los embriones ante un posible endurecimiento de la zona pelúcida. Adicionalmente, se puede utilizar para realizar una biopsia embrionaria para diagnóstico genético preimplantacional (DGP); esta técnica analiza el material genético del embrión previo a su implantación en diferentes estadios de desarrollo, ya sea D+3 analizando una blastómera, o en blastocisto analizando células del trofoectodermo (Lu *et al.*, 2019).

El *hatching* asistido por láser es el método más común debido a sus ventajas, entre las que se encuentran tiempo de exposición corto, funcionamiento sencillo, colocación precisa, contacto indirecto, seguridad y eficacia. Dentro de esta técnica se diferencian la perforación y el adelgazamiento de la zona. Por un lado, la perforación crea un orificio único, por varios pulsos de láser, en la zona pelúcida que rompe la membrana interna. Por otro lado, el adelgazamiento reduce el grosor en un área de la capa externa de la zona pelúcida, manteniendo intacta la capa interna. Por tanto, el adelgazamiento provoca menos riesgos para el embrión en comparación con la perforación, ya que no existe ningún orificio a través del cual las blastómeras puedan escapar o quedar atrapadas (Wang *et al.*, 2023). Sin embargo, un análisis realizado por Liu *et al.*, (2022) mostró que el *hatching* asistido por láser es la técnica predominante y que la perforación de la zona pelúcida es la principal técnica utilizada. Cabe destacar que el *hatching* asistido también pueden presentar una serie de inconvenientes, siendo el riesgo de gemelos monocigóticos uno de los más prominentes (Dallagiovanna *et al.*, 2021)

Con lo que respecta a la vitrificación, hay estudios que muestran mayores probabilidades de éxito en la transferencia con blastocistos eclosionados de forma espontánea, frente a no eclosionados (Quintans *et al.*, 2003). Resultados similares obtuvieron Endo *et al.*, (2021) en su estudio, apoyando el uso del *hatching* asistido previo a la transferencia en blastocistos vitrificados debido al incremento en la tasa de recién nacidos. Además, el grado de eclosión está relacionado positivamente con la tasa de

embarazo y nacido vivo (Han *et al.*, 2024). Del mismo modo, otros autores quisieron comprobar el efecto del *hatching* asistido en blastocistos previo a la vitrificación; Zech *et al.*, (2005) afirmaron obtener altas tasas de supervivencia, embarazo y parto, con respecto a blastocistos no eclosionados. Sin embargo, no todos los estudios llegan a la misma conclusión en lo que al uso de esta técnica del *hatching* previo a la transferencia se refiere, ya que Alteri y colaboradores no encontraron mejoras en la tasa de recién nacidos vivos (Alteri *et al.*, 2024).

1.4. Cambios epigenéticos producidos por la vitrificación

La regulación epigenética es un mecanismo que afecta a la expresión genética y produce modificaciones hereditarias sin la alteración de la secuencia de DNA y, por tanto, pueden afectar en la salud del individuo. El entorno puede influir en la expresión de los genes, así como los procesos llevados a cabo en las técnicas de reproducción asistida, como la vitrificación embrionaria. Las modificaciones epigenéticas más comunes son las metilaciones del DNA, que se mantienen en las células hijas gracias a las enzimas DNA metil transferasa (DNMT) y provocan la inactivación o silenciamiento de los genes. Por otra parte, se encuentran las modificaciones de histonas, como la acetilación, que induce una activación transcripcional de los genes. Y, por último, los *small-RNAs*, pequeñas moléculas de RNA no codificantes que suelen bloquear la expresión de ciertos genes y, por tanto, inducen cambios epigenéticos (Osman *et al.*, 2018).

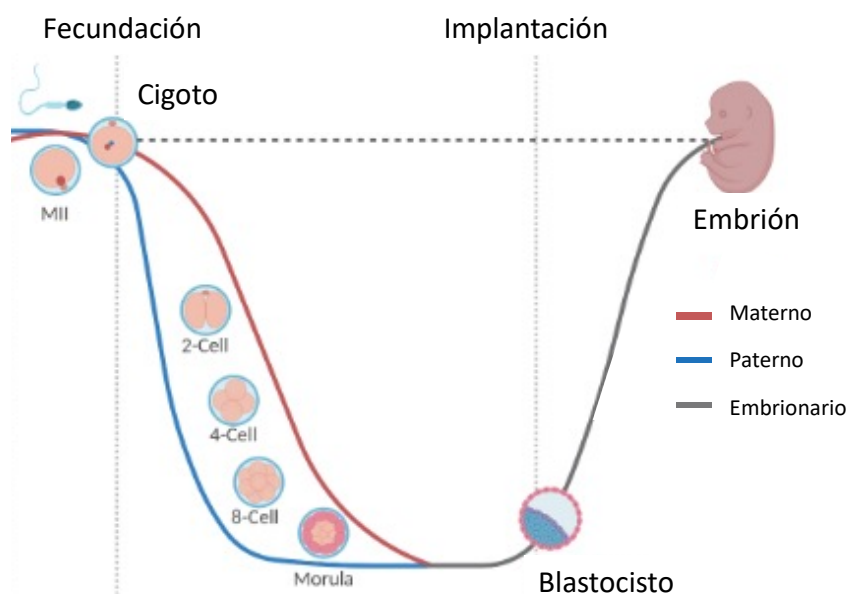


Figura 3. Patrones de metilación en el embrión (Mod. Smallwood and Kelsey, 2012).

Desde que se produce la fecundación, el embrión sufre cambios epigenéticos de manera dinámica (**Figura 3**). Por una parte, se produce una pérdida de metilación, activa en el gameto paterno por parte de las enzimas Tet metilcitosina dioxigenasa (TET), y pasiva en el materno por la ausencia de las DNMT; permitiendo por tanto la activación del genoma del embrión y la adquisición de la totipotencia celular (Singh *et al.*, 2023). Posteriormente, a partir de la fase de división, los niveles de metilación van aumentando gradualmente hasta que se produce la implantación (Osman *et al.*, 2018; Sciorio *et al.*, 2023). Cabe destacar que, si se produce cualquier alteración en el proceso de reprogramación epigenética del embrión, podría inducirse una expresión aberrante de genes, o graves alteraciones en la salud reproductiva.

Durante los últimos años se ha encontrado una correlación entre las diferentes técnicas de reproducción asistida y la epigenética de los embriones resultantes, lo que resulta una preocupación de cara al uso de esta técnica. Concretamente, la vitrificación puede llegar a afectar de manera significativa la expresión y metilación de numerosos genes en embriones animales, mientras que en humanos parece no tener ninguna influencia (Chen *et al.*, 2022). En particular, en diferentes estudios se comparó el nivel de metilación del gen H19/IGF2 de embriones vitrificados frente a embriones en fresco, obteniendo niveles más bajos en el caso de embriones no vitrificados, aunque con diferencias no significativas (Osman *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2022). Recientemente, se estudió la influencia del DMSO en la actividad de las enzimas DNMT3 y TET1. La enzima DNMT3, importante para la metilación de novo y para su mantenimiento, se encontraba regulada al alza, mientras que la TET1, importante en la desmetilación activa, estaba regulada a la baja (Sciorio *et al.*, 2023; Wiltshire *et al.*, 2023). Estos resultados sugieren que el proceso de vitrificación que usa DMSO como CPAs, induce cambios en el epigenoma. Sin embargo, los estudios realizados en humanos parecen no ser suficientes para dar una conclusión clara sobre el tema (Estudillo *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022; Sciorio *et al.*, 2023). Sí bien es cierto que el estrés inducido por la vitrificación (choque osmótico, cambios de temperatura, CPAs, etc.) podría provocar cambios epigenéticos en los embriones, aunque actualmente no están claras las posibles consecuencias en la salud de la futura descendencia (Liu *et al.*, 2023; Sciorio *et al.*, 2023).

1.5. ¿Cuándo y en qué estadio vitrificar?

La vitrificación garantiza una supervivencia elevada de los embriones, independiente de cuando hayan sido vitrificados; los embriones pueden ser vitrificados en diferentes estadios de desarrollo: cigoto con dos pronúcleos (PN), en división, mórula o blastocisto. La vitrificación en estadio de blastocisto ofrece la posibilidad de seguimiento en cultivo del embrión, y con ello, de evaluar su desarrollo (Nagy *et al.*, 2020). Un estudio realizado por Eftekhar *et al.*, (2020) comparó la eficacia de transferencia de embriones vitrificados en estadio de blastocisto frente al estadio en división, obteniendo resultados favorables en cuanto a implantación, embarazo y tasa de nacido vivo cuando se vitrificaba en blastocisto. Esto es debido al elevado potencial de implantación y mayor resistencia a los procesos de vitrificación y desvitrificación que presentan los embriones en estadio de blastocisto, por la presencia de un mayor número de células (Eftekhar *et al.*, 2020; Nagy *et al.*, 2020). En cambio, la posibilidad de vitrificar en estadio de cigoto (2 PN) se ofrece, principalmente, a aquellas pacientes con pocos ovocitos fertilizados o con un desarrollo pobre de los mismos, o incluso por cuestiones legales ya que, por ejemplo, en Alemania no está permitida la vitrificación en estadios embrionarios donde el material genético de ambos progenitores haya sido fusionado. De esta forma, se elimina el cultivo prolongado de los embriones hasta blastocisto, sin embargo, se pierde la ventaja de selección de embriones con un buen desarrollo (Nagy *et al.*, 2020).

Por otra parte, la estrategia de vitrificación de todos los embriones, conocida comúnmente como “*freeze-all*” está siendo acuñada como alternativa a la transferencia en fresco (Bourdon *et al.*, 2021). Realmente, esta técnica va dirigida a pacientes con riesgo de hiperestimulación ovárica (RHO), programas de DGP, elevados niveles de progesterona (>1 ng/mL) ya que se ha demostrado que afecta negativamente a la receptividad endometrial, o patologías uterinas que puedan afectar a la implantación, reduciendo con ello la fertilidad (Celada and Bosch, 2020; Eftekhar *et al.*, 2020; Venetis *et al.*, 2023). Esta técnica podría proponerse como estrategia de rescate para aumentar la tasa de nacidos vivos o, como estrategia programada, en función de las características de la mujer, garantizando mejores condiciones para la transferencia y limitando los efectos adversos de la estimulación ovárica. Sin embargo, los resultados no se asocian a un

aumento significativo en la tasa de nacidos vivos en todos los casos, es por ello por lo que se debe estudiar bien a qué grupos concretos beneficia esta técnica (Bourdon *et al.*, 2021).

1.6. Doble vitrificación de embriones

Actualmente, los ciclos con ovocitos de donante son aproximadamente el 70% de los casos que aparecen en las clínicas, y la tendencia se centra en usar ovocitos vitrificados ya que ofrece la ventaja de no tener que sincronizar entre donante y receptora. En estos casos, los embriones resultantes supernumerarios se vitrificarían, sufriendo por tanto una doble vitrificación. Sin embargo, este no es el único caso que se puede encontrar de doble vitrificación, ya que cada vez más mujeres, por razón social o médica, desean preservar su fertilidad vitrificando sus ovocitos. Adicionalmente, otra de las situaciones más comunes en las que hay que recurrir a una segunda vitrificación es ante un resultado de DGP no informativo o no concluyente, en cuyo caso habría que desvitrificar, analizar y revitrificar el blastocisto. Ocasionalmente, en la práctica clínica de la reproducción asistida hay situaciones que no pueden ser controladas por completo, que hacen modificar levemente el planteamiento original de un ciclo, conllevando también a una doble vitrificación como, por ejemplo:

- El día que se va a realizar la transferencia de un embrión vitrificado, hay un desarrollo endometrial anómalo (impedimento fisiológico).
- El día que se va a realizar la transferencia de un embrión vitrificado, es imposible canalizar el cuello del útero (impedimento físico).
- Al inicio del ciclo solo se plantean análisis genético de unos embriones, y posteriormente analizan el resto (impedimento económico).
- Catástrofes mundiales: pandemia, guerras, etc. (impedimento sanitario).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Por todo lo anteriormente expuesto, la hipótesis de este trabajo afirma que la doble vitrificación de embriones, independientemente del estadio de vitrificación y de la realización de biopsia, afecta negativamente a los resultados perinatales una vez sean transferidos al útero materno. Para ello se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de la doble vitrificación de embriones biopsiados en los resultados obtenidos después de un ciclo de FIV.
2. Comparar el efecto de la doble vitrificación en estadio de embrión con relación a la supervivencia del embrión, la tasa de embarazo, recién nacido vivo y aborto, con respecto a la simple vitrificación.
3. Analizar el efecto de la vitrificación de embriones procedentes de ovocitos vitrificados con respecto a los resultados de la FIV.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Estrategia de búsqueda en bases de datos

Para realizar esta revisión, los materiales utilizados son principalmente artículos publicados e indexados en bases de datos especializadas, principalmente PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Research Gate (<https://www.researchgate.net/>), o Google Scholar (<https://scholar.google.es/>).

3.2. Criterios de inclusión y exclusión

Los artículos seleccionados para el contenido específico de esta revisión, para dar respuesta a la hipótesis inicial y a los objetivos se centran en humanos. Las palabras clave se consultaron aisladas o combinadas mediante símbolos booleanos (+, -, *, ...): *double vitrification, assisted hatching, collapse, shrinkage, biopsy, live birth rate, refreeze, blastocyst, oocyte*.

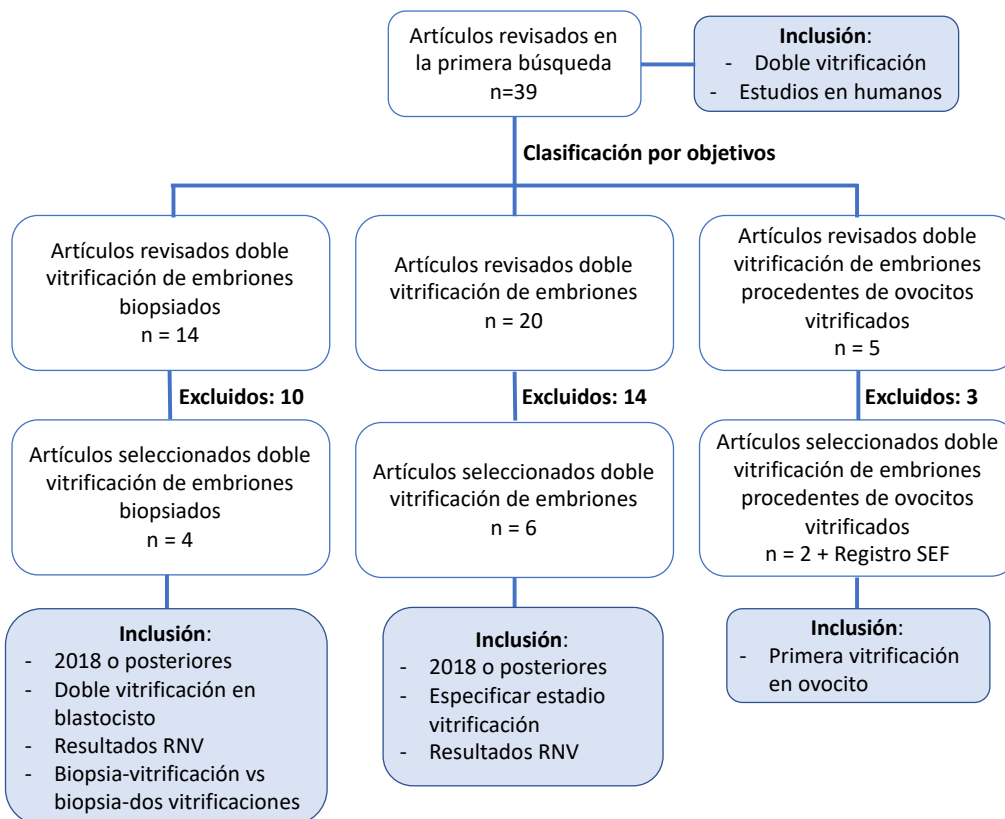


Figura 4. Diagrama de flujo que resume el proceso de selección de la bibliografía empleada (Elaboración propia).

Mediante estas consultas, se identificaron 39 artículos potenciales que cumplían la mayoría de los criterios generales: tema principal (doble vitrificación) y estudio en humanos. Estos artículos se agruparon en tres tipos, en función de los objetivos del trabajo, y se realizaron exclusiones si no cumplían algún criterio de los considerados específicos. Para la selección de los artículos que abordan el efecto de la doble vitrificación en embriones biopsiados, se utilizaron como criterios de inclusión que fueran recientes (publicados en 2018 o posteriores), que fueran resultado de dos vitrificaciones en blastocisto, con resultados de RNV, y que compararan los resultados de biopsia y vitrificación frente biopsia y dos vitrificaciones. Así, fueron seleccionados cuatro artículos (Aluko *et al.*, 2021; Theodorou *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023). En el caso de los que tratan sobre la doble vitrificación en estadio de embrión, los criterios fueron la fecha de publicación (2018 o posteriores), los resultados de RNV y con datos precisos del estadio en el que se vitrifica, obteniéndose un total de seis artículos (Mizobe *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Makieva *et al.*, 2023; Nanassy *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2024; Oraiopoulou *et al.*, 2024). Sin embargo, en el caso de los artículos sobre la doble vitrificación de embriones que provienen de ovocitos ya vitrificados únicamente se tomó como criterio de inclusión la primera vitrificación en ovocitos; debido a que los artículos obtenidos eran pocos, no se tuvo en cuenta ni el año de publicación ni los resultados de RNV, pues solo se identificaron dos artículos con este contenido (Cobo *et al.*, 2013; Ramadan *et al.*, 2022). A modo de resumen, todos los datos del proceso se presentan en un diagrama de flujo (**Figura 4**). Con los artículos seleccionaron (**Tabla 3**) según el proceso mencionado, se evaluaron los resultados obtenidos en cada uno de ellos y extrajeron sus conclusiones finales.

3.3. Artículos incluidos en el estudio

Las características de cada uno de los artículos seleccionados, referentes a los procedimientos realizados, participantes y otras características relevantes, agrupándolos con relación al objetivo deseado, son las explicadas a continuación:

3.3.1. Doble vitrificación de embriones biopsiados

Cuatro artículos, siendo todos ellos estudios retrospectivos, fueron los que cumplían con todos los criterios de inclusión que finalmente se seleccionaron (Aluko *et al.*, 2021; Theodorou *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023).

El primer artículo publicado (Aluko *et al.*, 2021) se trata de un estudio de pacientes sometidas a ciclos de FIV entre el 1 de julio de 2013 y el 1 julio de 2017. En este estudio se quería comprobar si la doble vitrificación en conjunto con la biopsia influye negativamente en los resultados obtenidos tras un ciclo de FIV; para ello, se incluyeron en él únicamente ciclos de transferencias de un único embrión que había sido cultivado hasta blastocisto, y las pruebas de DGP se realizaron mediante biopsia de trofoectodermo. Aluko y colaboradores comparan los resultados de una biopsia-una vitrificación, frente a una biopsia-dos vitrificaciones y a dos biopsias-dos vitrificaciones; sin embargo, para este análisis solo se tendrán en cuenta las dos primeras. Todas las pacientes fueron estimuladas con gonadotropinas, llevando a cabo un protocolo largo o corto en función de las características de cada una; la extracción de los ovocitos se llevó a cabo a las 36-38 horas desde la inducción de la ovulación, y después de la fecundación se llevaron a cultivo hasta blastocisto, momento en el que se biopsiaron o vitrificaron. Cabe destacar que la edad de las pacientes se encontraba entre los 33 y los 38 años, ya que una de las principales indicaciones para realizar el DGP es la edad materna avanzada. Finalmente, se estudiaron la tasa de embarazo bioquímico, clínico, RNV y abortos, principalmente.

El siguiente artículo que trataba de dar respuesta al mismo planteamiento (Theodorou *et al.*, 2022), incorporó pacientes que habían tenido una transferencia de único embrión entre el 1 de enero de 2015 y el 30 de junio de 2020 en el Centro de Salud Reproductiva y Genética (CRGH) de Londres. En este caso había tres grupos comparativos: (i) blastocistos biopsiados y posteriormente vitrificados; (ii) blastocistos previamente vitrificados, que se biopsiaron y re-vitrificaron, y (iii) embriones en D+3 vitrificados, biopsiados en blastocisto y revitrificados. Sin embargo, el último grupo (iii) no fue incluido en nuestro estudio. Todas las pacientes fueron estimuladas de manera controlada con protocolos largo o cortos, y la extracción de los ovocitos se realizó a las 36 horas del desencadenamiento de la ovulación. Posteriormente fueron fecundados y cultivados hasta estadio de blastocisto, donde fueron biopsiados o vitrificados en función del grupo al que pertenecían. La edad de las pacientes en este caso se encontraba entre los 34 y los 40 años. Finalmente, se estudiaron la tasa de embarazo bioquímico, clínico, RNV y aborto espontáneo.

El año siguiente se realizó otro estudio (Li *et al.*, 2023) con ciclos de transferencia de embrión único entre septiembre de 2016 y marzo de 2021. Del mismo modo que en

los anteriores casos, las pacientes fueron estimuladas, y una vez extraídos los ovocitos fueron fecundados y cultivados hasta estadio de blastocisto. En este artículo, se comparaba únicamente blastocistos biopsiados y vitrificados, frente a blastocistos biopsiados y revitrificado, por tanto, todos los datos fueron utilizados en nuestro estudio. En este artículo, la edad de las pacientes abarcaba un rango mayor ya que se encontraban entre los 24 y los 38 años. Finalmente, e igual que en los anteriores artículos, los principales resultados clínicos que se estudiaron eran la tasa de embarazo bioquímico, clínico, RNV y abortos.

Por último, el estudio de Zhang *et al.*, (2023) realizado entre enero de 2014 y diciembre de 2018 en el Centro de Medicina Reproductiva de la Facultad de Medicina Cheeloo de la Universidad de Shandong, comparó el efecto de una vitrificación frente a dos en blastocistos biopsiados. El procedimiento de estimulación ovárica, punción, inseminación, cultivo hasta blastocisto, vitrificación y biopsia de trofoectodermo fue el mismo que en los casos anteriores. Las pacientes que fueron incluidas en el estudio tenían entre 21 y 45 años, y los resultados que se tuvieron en cuenta fueron nuevamente la tasa de embarazo bioquímico, clínico, RNV y abortos.

3.3.2. Doble vitrificación en diferentes estadios embrionarios

Los artículos seleccionados que comparaban la doble vitrificación frente a la simple, siendo estas dos vitrificaciones realizadas en estadio de embrión, fueron seis estudios retrospectivos (Mizobe *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Makieva *et al.*, 2023; Nanassy *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2024; Oraiopoulou *et al.*, 2024).

El primero (Wang *et al.*, 2021) incluyó todos los ciclos que se realizaron entre enero de 2014 y diciembre de 2018 en el Centro de Medicina Reproductiva del Hospital Tongji, Facultad de Medicina Tongji, Universidad Huazhong de Ciencia y Tecnología. En él, las parejas sometidas a análisis genético preimplantacional fueron excluidas. Las pacientes utilizaron protocolos de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para la estimulación ovárica, y 36 horas después de la inducción de la ovulación se llevó a cabo la extracción de los ovocitos. Posteriormente fueron fecundados y los embriones resultantes se cultivaron hasta el estadio de blastocisto, donde fueron colapsados artificialmente antes de ser vitrificados. Las dobles vitrificaciones tenían lugar en diferentes situaciones: dos embriones vitrificados en la misma pajueta, pero se realiza

transferencia de embrión único, o estado físico inadecuado de la paciente el día de la transferencia que requiere revitrificación del embrión ya descongelado. La edad de las pacientes incluidas en el estudio se encontraba entre los 27 y los 36 años. Finalmente, los resultados que estudiaron más profundamente fueron la implantación, embarazo clínico, RNV y abortos.

Ese mismo año, se realizó otro estudio (Mizobe *et al.*, 2021) de los ciclos realizados entre abril de 2012 y marzo de 2014, excluyendo aquellos en los que se hubiera efectuado el análisis preimplantacional del embrión. De igual forma que en el caso anterior, se quiso comparar el efecto de dos vitrificaciones frente a una en estadio de blastocisto; aunque también comparaban el efecto de una tercera vitrificación, esos datos no serán incluidos en nuestro análisis. Las pacientes, de entre 30 y 39 años, fueron sometidas a un tratamiento de estimulación previo a la extracción de los ovocitos, que se fecundaron y cultivaron hasta blastocisto. Los resultados que se estudiaron fueron la tasa de embarazo clínico, implantación, RNV y aborto.

El siguiente artículo incluido se centraba en el efecto de la doble vitrificación de embriones en cuanto a la tasa de recién nacido vivo (Makieva *et al.*, 2023); incluyendo ciclos entre enero de 2017 y diciembre de 2021. Nuevamente fueron excluidas del estudio aquellas parejas que se sometieron a un DGP. La estimulación ovárica se llevó a cabo mediante protocolos largos o cortos, y después de la extracción ovocitaria se fecundaron los ovocitos obtenidos. En este estudio se comparaba la simple frente a la doble vitrificación embrionaria, siendo la primera de ella en estadio de cigoto (2 PN) y la segunda en estadio de blastocisto; en los casos de simple vitrificación, esta se realizó en estadio de blastocisto. Las participantes de este estudio se encontraban entre los 31 y 39 años en el momento de la extracción de los ovocitos. El resultado primario analizado fue el de nacidos vivos, aunque también se estudiaba la supervivencia del embrión, embarazo clínico, embarazo bioquímico y aborto.

Ese mismo año se realizó otro estudio (Nanassy *et al.*, 2023) centrado en los casos de transferencias de embriones en el centro entre los años 2015 y 2020. Igual que en el caso anterior, se comparaban dos vitrificaciones (2 PN y blastocisto) frente a una (blastocisto); excluyendo los ciclos con DGP. Para ello, las pacientes fueron estimuladas con agonista o antagonista de la GnRH, los ovocitos fueron extraídos, fecundados y los cigotos (2 PN) no vitrificados siguieron en cultivo hasta estadio de blastocisto. Las

pacientes que fueron incluidas en el estudio tenían entre 32 y 34 años, y los resultados que se tuvieron en cuenta fueron la tasa de embarazo bioquímico, clínico, RNV y abortos.

Posteriormente, Huang *et al.*, (2024) realizó un estudio que tenía como objetivo evaluar los resultados de embarazo y neonatales de blastocistos vitrificados dos veces derivados de embriones vitrificados una vez. La realización de DGP fue nuevamente usada como criterio de exclusión del estudio. Tanto el protocolo largo como el corto fueron usados para estimular a las participantes, y a las 36 horas de la inducción de la ovulación se llevó a cabo la extracción de los ovocitos, que posteriormente fueron fecundados. En este caso, la primera vitrificación se llevaba a cabo en estadio de división, por tanto, una vez fecundados serían cultivados hasta este punto, y la segunda vitrificación, al igual que la vitrificación simple en su caso, se realizó en estadio de blastocisto. Cabe destacar que antes de llevar a cabo la vitrificación en blastocisto, se realizó el colapso artificial mediante el uso del láser. Las participantes del estudio tenían entre 28 y 36 años, y los resultados para tener en cuenta en la discusión fueron la supervivencia del embrión, embarazo clínico, embarazo bioquímico, implantación, RNV y aborto.

Por último, ese mismo año se llevó a cabo otro estudio (Oraipoulou *et al.*, 2024) desde junio 2013 a marzo de 2021 que comparaba los resultados clínicos entre una vitrificación simple y doble de embriones; sin embargo, en este caso, tanto la primera como la segunda vitrificación se llevaron a cabo en estadio de blastocisto. Nuevamente, los ciclos con DGP fueron excluidos del estudio. Las pacientes, de entre 28 y 38 años, fueron estimuladas, se extrajeron sus ovocitos y fueron fecundados y cultivados hasta blastocisto, donde se llevó a cabo la vitrificación, en este caso sin colapso previo del blastocito. Finalmente, se estudiaron la tasa de embarazo bioquímico, embarazo clínico, RNV y abortos, principalmente.

3.3.3. Doble vitrificación de embriones procedentes de ovocitos vitrificados

Como se comentó anteriormente, los artículos que tratan sobre la transferencia de embriones vitrificados desarrollados a partir de ovocitos vitrificado son más heterogéneos y, por tanto, los criterios de inclusión no son tan específicos (Cobo *et al.*, 2013; Ramadan *et al.*, 2022). Ambos artículos son estudios retrospectivos.

El primero de los artículos (Cobo *et al.*, 2013) compara los resultados de FIV, tales como RNV, embarazo clínico, implantación y supervivencia del embrión, obtenidos de una transferencia de embriones vitrificados procedentes de ovocitos vitrificados frente a ovocitos frescos. Se trata de un estudio de ciclos que tuvieron lugar entre enero de 2007 y junio de 2010, y en este caso no se realizó ningún tipo de exclusión. El procedimiento de estimulación ovárica se llevó a cabo mediante un protocolo largo o corto, y los embriones resultantes de la fecundación fueron cultivados hasta estadio de división (D+3) o blastocisto, momento en el que se llevó a cabo la vitrificación; cabe destacar que, previa a la vitrificación de blastocisto, se realizó el colapso del blastocele con el uso del láser. En este artículo, los ovocitos procedían de donantes, cuya edad estaba comprendida entre los 26 y los 27 años, o podían proceder de la propia pareja, siendo en este caso la edad de las mismas entre los 34 y los 44 años.

Por otra parte, el otro estudio (Ramadan *et al.*, 2022) se centra en los ciclos comprendidos entre diciembre de 2013 y junio de 2019 y comparaba, principalmente, la tasa de embarazo clínico de transferencias de blastocistos vitrificados frente a frescos, que procedían de ovocitos vitrificados. Los embriones que habían sido sometidos a DGP fueron excluidos del estudio. En este caso, se usaron ovocitos de donante y no especifica ni la edad de estas, ni el procedimiento de estimulación ovárica.

Adicionalmente, dentro de este apartado, se consultó el registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) correspondiente al año 2021 (SEF, 2021), los datos más recientes que se pueden obtener hasta el momento. Concretamente, se han obtenido los datos de las transferencias de embriones vitrificados procedentes de ovocitos vitrificados y de embriones en fresco procedentes de ovocitos vitrificados, con fines comparativos.

3.4. Análisis estadístico

Para realizar un estudio más profundo, e interpretar más objetivamente los datos, se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos en cada uno de los artículos, referentes a la tasa de embarazo bioquímico, embarazo clínico, recién nacido vivo y aborto. El análisis estadístico elegido fue el Odd Ratio (OR) con intervalos de confianza (IC) del 95%. Todos los artículos fueron analizados de manera conjunta y por subgrupos, de acuerdo con la realización o no de una biopsia de trofoectodermo para llevar a cabo el DGP, o en función de si la primera vitrificación tuvo lugar en el ovocito,

o directamente en cualquier estadio embrionario. De igual forma, se compararon los resultados en función de los estadios en los que se llevan a cabo las vitrificaciones. Mediante la realización de tablas de contingencia y gráficos de bosque se interpretaron los resultados. De igual forma, se calculó el p -valor utilizando la prueba de chi-cuadrado (X^2) de independencia, utilizando el mismo valor de significancia (95%) para comprobar si las diferencias entre los grupos eran significativas o no. Todos los cálculos fueron realizados con el programa estadístico SPSS.

Tabla 3. Resumen de la revisión de artículos utilizados para el metaanálisis. **EB:** embarazo bioquímico, **EC:** embarazo clínico, **RNV:** recién nacido vivo, **AE:** aborto espontáneo, **IE:** implantación embrionaria, **SE:** supervivencia del embrión, **SV:** simple vitrificación, **DV:** doble vitrificación.

Objetivo	Autores y año	Estadio embriones		DGP	Colapso	Número de ciclos		Resultados
		Vitrificación	Re-vitrificación			SV	DV	
DV en embriones biopsiados	Aluko <i>et al.</i> , 2021	Blastocisto	Blastocisto	Sí	Sí	2603	95	EB, EC, RNV, AE
	Theodorou <i>et al.</i> , 2022	Blastocisto	Blastocisto	Sí	Sí	451	146	EB, EC, RNV, AE
	Li <i>et al.</i> , 2023	Blastocisto	Blastocisto	Sí	Sí	177	30	EB, EC, RNV, AE
	Zhang <i>et al.</i> , 2023	Blastocisto	Blastocisto	Sí	No	97	117	EB, EC, RNV, AE
DV en embriones	Wang <i>et al.</i> , 2021	Blastocisto	Blastocisto	No	Sí	244	216	IE, EC, RNV, AE
	Mizobe <i>et al.</i> , 2021	Blastocisto	Blastocisto	No	No	306	82	IE, EC, RNV, AE
	Makieva <i>et al.</i> , 2023	Cigoto (2PN)	Blastocisto	No	Sí	310	97	SE, EB, EC, RNV, AE
	Nanassy <i>et al.</i> , 2023	Cigoto (2PN)	Blastocisto	No	No	189	122	EB, EC, RNV, AE
	Huang <i>et al.</i> , 2024	División	Blastocisto	No	Sí	337	73	SE, IE, EB, EC, RNV, AE
	Oraipoulou <i>et al.</i> , 2024	Blastocisto	Blastocisto	No	No	450	252	EB, EC, RNV, AE
DV de ovocitos vitrificados	Cobo <i>et al.</i> , 2013	Ovocito	Blastocisto	-	Sí	2629	471	SE, IE, EC, RNV
	Registro SEF, 2021	Ovocito	Blastocisto	-	-	7027	7349	EC, RNV, AE
	Ramadan <i>et al.</i> , 2022	Ovocito	Blastocisto	No	No	409	191	EC

A la vista de la **Figura 5**, la mayoría de los artículos muestran diferencias no significativas ($p > 0,05$) entre el uso de una simple vitrificación, frente a una doble vitrificación. No obstante, también en la gran mayoría de ellos se obtienen mejores resultados en aquellos ciclos en los que se realizó una vitrificación simple; por una parte, la tasa de embarazo y RNV se ve favorecida con la técnica de simple vitrificación, mientras que el aborto está más aumentando con el uso de la doble vitrificación.

4.1. Efecto de la doble vitrificación en embriones biopsiados

Los cuatro artículos seleccionados aportaban datos sobre los resultados de embarazo bioquímico, embarazo clínico, tasa de recién nacidos vivo y aborto espontáneo. Los criterios de exclusión, así como los procedimientos que se llevaron a cabo en cada uno de ellos para la estimulación, extracción, vitrificación y biopsia de trofoectodermo fueron equiparables en todos los casos. Las diferencias que pueden encontrarse entre estos cuatro artículos se centran en el número de ciclos incluidos en cada caso de estudio, ya que por ejemplo Aluko *et al.*, (2021) incluye 2603 ciclos de simple vitrificación, frente a 451, 177 y 97 ciclos que analizan los otros autores (Theodorou *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023 respectivamente). Por otra parte, para el caso de doble vitrificación, comprende un número más reducido de ciclos (117, 146, 95 y 30, respectivamente).

A la vista de los resultados correspondientes a la tasa de embarazo bioquímico (**Figura 6A**) obtenidos en los ciclos de embriones que habían sufrido una doble vitrificación y una biopsia de trofoectodermo es significativamente menor que en aquellos que únicamente pasaron por una biopsia seguida de una vitrificación (OR: 0,73; IC: 0,585 - 0,903; p-valor: 0,002). Por otra parte, los resultados asociados a la tasa de embarazo clínico (**Figura 6B**) seguían siendo superiores en el caso de una simple vitrificación y una biopsia, mostrando diferencias significativas (OR: 0,74; IC: 0,604 - 0,916; p-valor: 0,003). Con respecto a la tasa de RNV (**Figura 6C**) de cada uno de los grupos, los blastocistos biopsiados y vitrificados una única vez muestran tasas superiores por cada ciclo en comparación a los doblemente vitrificados (OR: 0,68; IC: 0,553 - 0,836; p-valor: 0,0002). Sin embargo, en el caso de la tasa de aborto espontáneo (**Figura 6D**), la doble

vitrificación parece afectar negativamente e incrementa el porcentaje de abortos (OR: 1,86; IC: 1,296 - 2,679; p-valor: 0,0004).

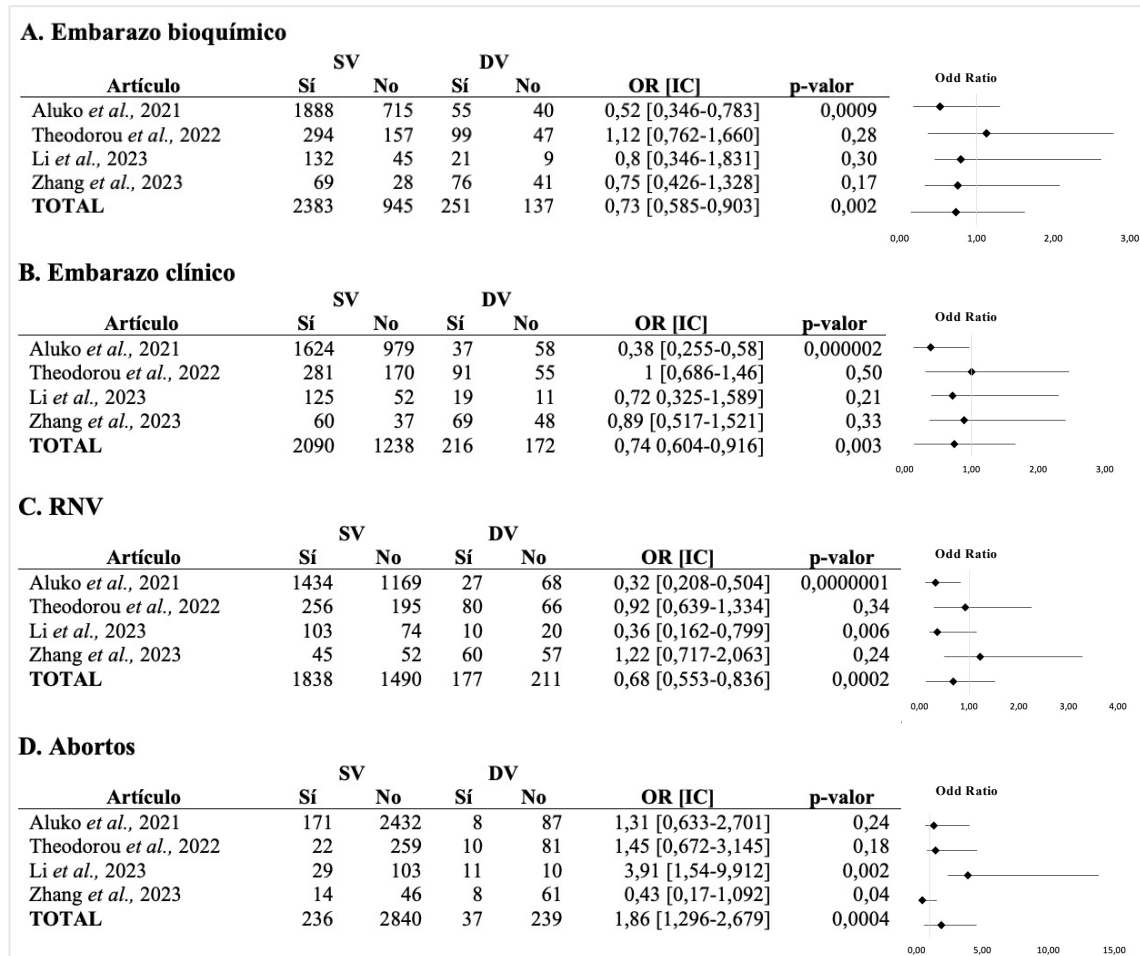


Figura 6. Comparación entre doble vitrificación (DV) y simple vitrificación (SV) de embriones biopsiados con respecto a: **A.** Embarazo bioquímico; **B.** Embarazo clínico, **C.** RNV; **D.** Abortos. OR: Odd Ratio; IC: Intervalo de confianza. Si $OR < 1$ favorece la SV, mientras que si $OR > 1$ favorece la DV.

4.2. Efecto de la doble vitrificación en estadio de embrión en los resultados después de un ciclo de fecundación in vitro

En este subgrupo de artículos (Mizobe *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Makieva *et al.*, 2023; Nanassy *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2024; Oraiopoulou *et al.*, 2024), ambas vitrificaciones tienen lugar en estadio de embrión, sin embargo, dos de ellos realizan la primera vitrificación en cigoto (2 PN), otro en estadio de división, y los tres restantes llevan a cabo dos vitrificaciones consecutivas en estadio de blastocisto. Por otra parte, datos sobre la tasa de embarazo bioquímico únicamente son aportados en cuatro de los

artículos (Makieva *et al.*, 2023; Nanassy *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2024; Oraiopoulou *et al.*, 2024), mientras que el resto de los resultados a analizar, véase embarazo clínico, RNV y aborto, son facilitados por todos los artículos seleccionados. Con respecto a la supervivencia del embrión después de la vitrificación, solo dos análisis proporcionaron resultados de su estudio (Makieva *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2024). El número de ciclos que se incluye en cada uno de los artículos ya sea para una simple vitrificación, o una doble, se pueden observar en la **Tabla 3**.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos tras realizar una vitrificación frente a dos, una vez el ovocito ya ha sido fecundado, se muestra en la **Figura 7**. Con respecto a la tasa de RNV (**Figura 7C**), algunos autores obtienen mejores resultados cuando se realiza una doble vitrificación (Mizobe *et al.*, 2021), mientras que otros siguen apoyando la vitrificación simple (Huang *et al.*, 2024), aunque en ninguno de los casos las diferencias entre ambos grupos son significativas (OR: 1,21; IC: 0,726 – 2,003; p-valor: 0,24 y OR: 0,95; IC: 0,558 – 1,601; p-valor: 0,42; respectivamente). Sin embargo, observando los datos en conjunto, se obtienen mejores resultados con la realización de una única vitrificación, con diferencias significativas en cuando a la tasa de RNV, embarazo y abortos ($p < 0,05$).

Como ya se comentó, la supervivencia del blastocisto después de la vitrificación fue analizada por dos estudios; por una parte, Makieva *et al.*, (2023), que realiza una primera vitrificación en cigoto (2 PN) y la segunda en blastocisto, obtienen un 98,4% de supervivencia en el caso de la doble vitrificación, y un 98,7% en el de simple, sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). Y, por otra parte, Huang *et al.*, (2024) muestran una supervivencia mayor en el caso de la doble vitrificación (99,01%) frente a la simple (98,45%) realizando la primera de ellas en estadio de división, aunque nuevamente se trataba de diferencias no significativas ($p > 0,05$).

encontradas al realizar la primera vitrificación en cigoto no son significativas, mientras que, al realizar las dos vitrificaciones en blastocisto, sí que lo son (OR: 0,82; IC: 0,575 – 1,167; p-valor: 0,14 y OR: 0,56; IC: 0,447 – 0,691; p-valor \approx 0; respectivamente). Por último, la doble vitrificación parece influir negativamente, de manera independiente al estadio en el que se realice la primera de ellas, en la tasa de aborto (**Figura 8D**). Sin embargo, las diferencias encontradas en ambos casos no son significativas (OR: 1,41; IC: 0,879 – 2,25; p-valor: 0,08 y OR: 1,3; IC: 0,881 – 1,925; p-valor: 0,1; respectivamente).

4.3. Efecto de la vitrificación de embriones procedentes de ovocitos vitrificados.

Como se comentó anteriormente, los datos aportados por ambos estudios que cumplían estas condiciones (Cobo *et al.*, 2013; Ramadan *et al.*, 2022) eran más heterogéneos y, por tanto, no se pudo llevar a cabo un análisis estadístico. El estudio realizado por Cobo *et al.*, (2013) concluye que la revitrificación de blastocistos que provienen de ovocitos ya vitrificados no afecta de manera significativa a la supervivencia después de la desvitrificación. Además, comparando la criotransferencia de blastocistos procedentes de ovocitos frescos o vitrificados, en el caso de los vitrificados doblemente se obtienen tasas superiores de implantación (35,4% vs 37,7%, respectivamente), embarazo clínico (41,9% vs 43,3%, respectivamente), y RNV (36,7% vs 40,9%, respectivamente), aunque en ninguno se trataba de diferencias significativas ($p > 0,05$). Por otra parte, Ramadan *et al.*, (2022) comparó la tasa de embarazo clínico en transferencias de blastocistos que procedían de ovocitos vitrificados. Los resultados obtenidos no presentaban una significación estadística ($p > 0,05$), sin embargo, con las transferencias en fresco se obtenía una tasa de embarazo superior, en comparación con las criotransferencias (38,63% vs 32,46%, respectivamente).

Parámetro	SV		DV		OR [IC]	p-valor	Odd Ratio
	Sí	No	Sí	No			
Embarazo clínico	3649	3378	2958	4391	0,62 [0,585-0,665]	4,18E-45	
RNV	2762	887	2091	867	0,77 [0,696-0,862]	0,000002	
Aborto	643	2119	653	1438	1,5 [1,32-1,696]	2,86E-10	

Figura 9. Comparación de los resultados extraídos del registro de la SEF que comparan la doble vitrificación (DV) y la simple (SV) con relación a la tasa de gestación, RNV y aborto. OR: Odd Ratio; IC: Intervalo de confianza. Si $OR < 1$ favorece la SV, mientras que si $OR > 1$ favorece la DV.

Por otra parte, la SEF dispone de datos de los ciclos realizados durante cada año, así como de los resultados neonatales obtenidos o posibles complicaciones que hayan surgido (SEF, 2021). En el año 2021, se realizaron 7027 transferencias en fresco de embriones procedentes de ovocitos vitrificados de donante, mientras que transferencias de embriones vitrificados derivados de ovocitos también vitrificados fueron 7349. A la vista de los resultados en la **Figura 9**, tanto la tasa de embarazo clínico (OR: 0,62; IC: 0,585 – 0,665; p-valor ≈ 0), como la de RNV (OR: 0,77; IC: 0,696 – 0,862; p-valor: 0,000002) se ven favorecidas al realizarse una vitrificación simple, es decir, cuando se lleva a cabo la transferencia en fresco de blastocitos procedentes de ovocitos previamente criopreservados. Por el contrario, la tasa de aborto es superior en el caso de la doble vitrificación (OR: 1,5; IC: 1,32 – 1,696; p-valor ≈ 0). Las diferencias en los tres casos son significativas ($p < 0,05$).

5. DISCUSIÓN

La doble vitrificación de embriones se ha convertido en una técnica ampliamente utilizada en las clínicas de reproducción asistida, especialmente con el creciente número de ciclos que involucran ovocitos vitrificados de donante. Esta práctica se emplea con el propósito de evitar la sincronización entre la donante y la receptora. Sin embargo, su aplicación no se limita únicamente a esta situación específica; de hecho, se llevan a cabo más revitrificaciones de las que se podría suponer inicialmente. En este contexto, se realizó un metaanálisis para evaluar el impacto de la revitrificación en los resultados de los ciclos de FIV. Los hallazgos indican que la doble vitrificación conlleva una disminución en las tasas de embarazo y recién nacidos vivos, así como un aumento en la tasa de abortos. Por tanto, se sugiere que, siempre que sea factible, se opte por la vitrificación simple en lugar de la doble vitrificación.

Algunos de los factores más importantes que se han tenido en cuenta para estudiar el efecto de la doble vitrificación son la supervivencia del embrión, la tasa de embarazo bioquímico, embarazo clínico, recién nacido vivo y abortos espontáneos. Por una parte, la supervivencia del embrión después la descongelación puede verse influenciada tanto por el método de criopreservación, como por los estadios en los que se lleva a cabo el proceso. Diferentes estudios afirman que la congelación lenta de embriones en estadio de división afecta negativamente a la supervivencia de este, en comparación con el uso de la vitrificación (Casciani *et al.*, 2023). Como la vitrificación se basa en el uso de velocidades elevadas de enfriamiento, esto favorece la supervivencia del embrión al evitar la formación de cristales de hielo en su interior. El efecto perjudicial de los cristales de hielo podría afectar a los orgánulos intracelulares, membranas y citoesqueleto del embrión (Wang *et al.*, 2023). Por otra parte, el embarazo bioquímico se evalúa mediante la concentración de hormona gonadotropina coriónica humana (β -hCG) a los 12-14 días después de la transferencia (Wang *et al.*, 2021); y la tasa de embarazo bioquímico se define como la proporción de ciclos con resultados positivos de β -hCG con respecto al total de ciclos de transferencia realizados (Huang *et al.*, 2024). Asimismo, el embarazo clínico se determina por la presencia de latido cardíaco y saco gestacional mediante ecografía transvaginal a partir de las 8 semanas desde que se realizó la transferencia del embrión (Makieva *et al.*, 2023). Por consiguiente, la tasa de embarazo clínico es definida

como la proporción de ciclos con saco gestacional y latido frente a los ciclos totales de transferencia (Huang *et al.*, 2024). Por otro lado, uno de los principales objetivos que se persigue a la hora de realizar un ciclo de FIV es el recién nacido vivo, y la tasa de RNV se entiende como la proporción de nacidos vivos por transferencias embrionarias realizadas (Huang *et al.*, 2024). Por último, el aborto espontáneo es entendido como la pérdida del latido cardíaco fetal en las 20 semanas siguientes a la confirmación del embarazo clínico (Wang *et al.*, 2021); en consecuencia, la tasa de aborto espontáneo se obtiene al dividir el número de ciclos con pérdida de embarazo por el número de ciclos totales con embarazo clínico (Huang *et al.*, 2024).

5.1. ¿Cuál es el efecto de la doble vitrificación en embriones biopsiados?

Los hallazgos obtenidos en este metaanálisis en relación con la tasa de embarazo bioquímico sugieren que la vitrificación simple de un blastocisto que ha sido biopsiado puede ofrecer resultados más favorables en comparación con la doble vitrificación. Sin embargo, no todos los autores parecen llegar a la misma conclusión. Por ejemplo, Theodorou *et al.*, (2022) en su investigación sobre el efecto de la doble vitrificación en embriones biopsiados, obtuvieron mejores tasas de embarazo bioquímico con la realización de dos vitrificaciones. Como ya se sabe, un factor importante es la realización de colapso asistido previo a la vitrificación, sin embargo, las discrepancias encontradas en los resultados de los diferentes artículos no parecen estar relacionadas con este factor, ya que algunos de los estudios que obtienen mejores resultados con la vitrificación simple realizan colapso previo (Aluko *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2023), y otros no (Zhang *et al.*, 2023).

Con relación a las tasa de éxito de embarazo clínico, la realización de la biopsia también implicó la obtención de resultados dispares en comparación a nuestro análisis, ya que, Aluko *et al.*, (2021) respaldaba el uso de la simple vitrificación para obtener mejores resultados en cuanto al embarazo clínico, mientras que Theodorou *et al.*, (2022) alcanzaba tasas superiores con la doble vitrificación. Sin embargo, en este estudio se ha comprobado que la doble vitrificación de embriones biopsiados no favorece la tasa de embarazo clínico. De igual forma que en el caso anterior, la realización del colapso asistido previo parece no ser el factor indicativo que modifique los resultados.

Por otra parte, los resultados obtenidos con respecto a la tasa de recién nacidos vivos obtenidos sugieren que la doble vitrificación de embriones biopsiados no favorece las probabilidades de éxito. Nuevamente, existen contradicciones a nuestro resultado en la literatura, ya que en el estudio realizado por Zhang *et al.*, (2023), se muestra una mejoría en las tasas de recién nacido vivo al llevar a cabo la segunda vitrificación del embrión. Por el contrario, autores como Aluko *et al.*, (2021), Theodorou *et al.*, (2022) o Li *et al.*, (2023) apoyan el resultado encontrado en este metaanálisis.

Por último, en este estudio se ha visto que la doble vitrificación de embriones biopsiados aumenta notablemente la probabilidad de aborto espontáneo ($p < 0,05$). Aunque la mayoría de los estudios muestran resultados similares a los de este metaanálisis, hay estudios como el de Li *et al.*, (2023) en los que parece que la doble vitrificación no afecta negativamente a la probabilidad de aborto, ya que se obtienen tasa inferiores.

5.2. ¿Cuál es el efecto de la doble vitrificación en estadio de embrión en los resultados después de un ciclo de fecundación in vitro?

Referente a la supervivencia del embrión, la doble vitrificación no parece alterar significativamente la tasa de éxito después de la desvitrificación. Cuando la primera de ellas se lleva a cabo en estadio de cigoto (2 PN), y la segunda en blastocisto, se observa una ligera disminución en la supervivencia del embrión, en comparación con una simple vitrificación en blastocisto (Makieva *et al.*, 2023). Sin embargo, si la primera vitrificación tiene lugar en estadio de división, se obtienen mejores tasas de supervivencia que con una única vitrificación en blastocisto (Huang *et al.*, 2024). Estos resultados pueden ser debidos a la diferencia en el número de células de cada uno de los estadios de desarrollo embrionario, ya que un mayor número puede estar asociado a mejor supervivencia a la vitrificación. Uno de los fenómenos que incrementa la supervivencia del embrión después de la vitrificación es la realización previa del colapso del blastocele, que se lleva a cabo principalmente mediante el uso de un pulso de láser. Este colapso induce la reducción del volumen interno del blastocisto, al favorecer la salida del agua, lo que evitaría la probabilidad de formación de cristales de hielo que puedan dañar al embrión (Boyard *et al.*, 2022; Kovačič *et al.*, 2022). El colapso asistido también puede llevarse a cabo en las dobles vitrificaciones, en el estadio de blastocisto. De esta forma, tanto Makieva *et al.*,

(2023) como Huang *et al.*, (2024) llevaron a cabo este procedimiento para aumentar la probabilidad de supervivencia del embrión.

Aunque la doble vitrificación, independientemente de los estadios en los que se realice, parece disminuir la probabilidad de embarazo bioquímico, no todos los estudios coinciden con nuestra conclusión. Por ejemplo, el estudio llevado a cabo por Makieva *et al.*, (2023) afirma obtener mejores resultados de embarazo bioquímico con la realización de dos vitrificaciones, llevando a cabo la primera de ellas en estadio de cigoto (2 PN). Sin embargo, Nanassy *et al.*, (2023) cuya primera vitrificación también tiene lugar en ese mismo estadio, obtiene mejores resultados con la vitrificación simple. Este mismo resultado presenta Huang *et al.*, (2024) en su estudio, aun cuando la primera de las vitrificaciones tiene lugar en estadio de división.

Por otra parte, los resultados relacionados con la tasa de embarazo clínico obtenido de embriones no biopsiados que habían sido vitrificados doblemente, no se veía favorecida por esta doble vitrificación, al compararse con una única vitrificación. Nuevamente, se obtuvieron algunos resultados contrarios. Por ejemplo, Nanassy *et al.*, (2023) llevó a cabo la primera de las vitrificaciones en estadio de cigoto (2 PN) y la segunda en blastocisto, obteniendo mejores resultados en cuanto a tasa de embarazo clínico al realizar una única vitrificación, misma conclusión a la que se llegó con nuestro metaanálisis; mientras que Makieva *et al.*, (2023), alcanzó mejores tasas, no estadísticamente significativas, con la realización de dos vitrificaciones en los mismos estadios que el primero de los estudios. Estas diferencias podrían ser debidas a que en el estudio Makieva *et al.*, (2023) los blastocistos fueron colapsados con antelación a la segunda vitrificación. De igual manera, al vitrificar los embriones de manera consecutiva en estadio de blastocisto, Oraiopoulou *et al.*, (2024) y Wang *et al.*, (2021) también encontraron resultados superiores con la simple vitrificación, mientras que Mizobe *et al.*, (2021) obtuvieron mejores resultados al llevar a cabo la vitrificación doble. En este caso, únicamente el estudio de Wang *et al.*, (2021) optó por la realización del colapso asistido, por tanto, las diferencias encontradas pueden no deberse a la realización del colapso.

Como se comentó anteriormente, el RNV es uno de los principales objetivos de las técnicas de reproducción asistida. Los resultados de este metaanálisis relacionados con la doble vitrificación de embriones no biopsiados parecen aumentar con la realización de

una única vitrificación, en lugar de dos. Algunos autores obtuvieron resultados similares a los de este metanálisis, por ejemplo, Nanassy *et al.*, (2023) cuya primera vitrificación se realizó en estadio de cigoto (2 PN) y Oraiopoulou *et al.*, (2024) que la llevó a cabo en blastocisto, mostraban mejores tasas de RNV con una vitrificación simple; esto podría indicar que el resultado es independiente de cuando se haya realizado la primera de las vitrificaciones. Sin embargo, resultados contrarios a los de este estudio obtuvieron Mizobe *et al.*, (2021) y Makieva *et al.*, (2023), aunque en ninguno de los ellos la mejoría encontrada con la doble vitrificación fue notable.

Por último, la doble vitrificación de embriones no biopsiados afecta negativamente a la tasa de aborto espontáneo, ya que los resultados del metaanálisis muestran tasas superiores cuando se llevan a cabo dos vitrificaciones, independientemente del estadio en el que se hayan llevado a cabo (Wang *et al.*, 2021; Theodorou *et al.*, 2022; Nanassy *et al.*, 2023; Oraiopoulou *et al.*, 2024). Si bien es cierto, que algunos autores observaron resultados comparables entre la simple y la doble vitrificación (Mizobe *et al.*, 2021; Makieva *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2024).

5.3. ¿Cuál es el efecto de la vitrificación de embriones procedentes de ovocitos vitrificados?

Los resultados de los estudios que se centran en embriones procedentes de ovocitos vitrificados muestran conclusiones divergentes, ya que en algunos estudios la tasa de embarazo clínico parece aumentar cuando se realiza la criotransferencia de embriones derivados de ovocitos vitrificados, en comparación con los obtenidos de ovocitos frescos (Cobo *et al.*, 2013). Por el contrario, el estudio de Ramadan *et al.*, (2022) así como los resultados del registro de la SEF (SEF, 2021) obtienen mejores tasas de éxito cuando se realiza una transferencia en fresco de embriones que provienen de ovocitos vitrificados. Cabe destacar, que en el primero de los casos se está comparando el éxito frente a una única vitrificación en blastocisto, mientras que en los otros dos casos se compara con una única vitrificación en ovocito, teniendo en cuenta que la vitrificación de ovocitos puede ocasionar mayor daño celular y peores resultados de supervivencia. Los resultados encontrados parecen ser contradictorios ya que, en el estudio de Cobo *et al.*, (2013) se obtienen mejores resultados al realizar la criotransferencia de embriones procedentes de ovocitos vitrificados. Esto podría deberse a un mejor control de la ventana de

implantación, pero, sin embargo, la vitrificación de ovocitos conllevaría una mayor acumulación de daño celular. Por otro lado, en el segundo caso se obtienen mejores resultados con la transferencia en fresco de embriones que proceden de ovocitos vitrificados que, por una parte, parece tener sentido porque no se produce una segunda vitrificación y, por tanto, no hay acumulación de daño, pero, por otra parte, contradice lo dicho anteriormente sobre la criotransferencia en relación con la receptividad endometrial.

Con respecto al efecto de la doble vitrificación de embriones que proceden de ovocitos ya vitrificados, esta también parece reducir la tasa de éxito de los recién nacidos vivos. Sin embargo, Cobo *et al.*, (2013) mostraba en su estudio un incremento de la tasa de RNV al realizar la criotransferencia de embriones procedentes de ovocitos vitrificados, apoyando por tanto la doble vitrificación frente a la simple. Finalmente, con respecto a la tasa de abortos espontáneos, nuestro metaanálisis muestra un incremento cuando se lleva a cabo la vitrificación de los embriones que proceden de ovocitos ya vitrificados, lo que indica un efecto perjudicial de la doble vitrificación sobre los embriones.

Por tanto, parece que la realización de la biopsia de trofoectodermo en embriones doblemente vitrificados, que implica la extracción de células para análisis genético, no afecta de manera directa a la tasa de embarazo, ya que se han realizado numerosos estudios con resultados similares entre los ciclos con biopsia y sin ella. Esto podría deberse a que los embriones biopsiados transferidos no presentan anomalías genéticas y, por tanto, muestran mejores tasas de embarazo. Las diferencias encontradas pueden deberse no solo al embrión, y los procedimientos que se llevan a cabo en él, sino posiblemente a otros factores determinados por la población de mujeres, como pueden ser la ventana de implantación o las bacterias del endometrio, que hacen que la receptividad endometrial sea mejor. Por tanto, parece ser que la doble vitrificación proporciona menores tasas de embarazo, independientemente del estadio en el que se lleven a cabo las dos vitrificaciones, de la realización de biopsia o del colapso del blastocele.

Adicionalmente, nuestro estudio mostró un impacto negativo de la vitrificación repetida en los resultados después de un ciclo de FIV en lo que se refiere a los nacidos

vivos. Es importante destacar que la tasa de recién nacidos vivos no solo depende de la calidad de los embriones transferidos, sino también de otros factores cruciales que tienen lugar durante el proceso de gestación, entre los que se encuentra la receptividad endometrial. Si bien es cierto que un embrión de alta calidad tendrá mejores posibilidades de supervivencia y desarrollo en comparación con uno de menor calidad. Es por ello por lo que ha de tenerse en cuenta el efecto negativo de la realización de vitrificaciones repetidas, ya que puede afectar a la supervivencia y la calidad del embrión.

Por último, los hallazgos encontrados en este metaanálisis muestran consecuencias desfavorables sobre el uso de la doble vitrificación, ya que se produce un aumento significativo en la tasa de abortos espontáneos con la recriopreservación, independientemente del momento en el que se lleven a cabo las vitrificaciones o de la realización de la biopsia. Una de las principales razones a las que se puede deber el aumento de los abortos es que al tener que sufrir los embriones dos vitrificaciones, estarían doblemente expuestos a elevadas concentraciones de CPAs, lo que podría ocasionar embriotoxicidad. Adicionalmente, la criopreservación podría estar causando daño en las células del trofoectodermo, dificultando su capacidad de adherencia al endometrio, provocando pérdidas de embarazo o abortos (Wang *et al.*, 2023). Por tanto, la doble vitrificación debería evitarse para reducir al máximo las probabilidades de sufrir un aborto espontáneo.

En resumen, en este estudio revisamos sistemáticamente una serie de artículos que tratan de explicar el impacto de la vitrificación múltiple en los resultados de un ciclo de FIV. Los hallazgos indicaron que la revitrificación puede resultar en tasas más bajas de embarazo y RNV, además de aumentar la tasa de aborto en comparación con la vitrificación simple, confirmando así la hipótesis planteada al inicio del análisis. No obstante, algunas de las discrepancias encontradas en los resultados de los diferentes estudios podrían estar relacionadas con el tamaño de la muestra, los estadios en los que se evalúa el efecto de las múltiples vitrificaciones (cigoto, división o blastocisto) o con otros factores a tener en cuenta, como la receptividad endometrial de cada paciente. Por ello, se recomienda priorizar el uso de la simple vitrificación, siempre que sea posible, sobre la doble vitrificación. Para futuras investigaciones, sugerimos la necesidad de

realizar más estudios centrados en el efecto de las criopreservaciones múltiples, con una muestra más amplia y teniendo en cuenta un mayor número de factores de confusión, para poder eliminarlos.

Aunque los resultados encontrados pueden indicar una reducción en las tasas de éxito de los resultados después de la FIV en los embriones doblemente vitrificados, no siempre pueden ser evitadas. Una de las principales causas de no embarazo es la no implantación del embrión, y puede ser debida a que el embrión no ha sido capaz de salir de la zona pelúcida. Por esta razón, pese a que el último estudio realizado sobre el efecto del *hatching* asistido no parezca mejorar notablemente la tasa de RNV (Alteri *et al.*, 2024), se podría implementar esta técnica ya que, en el caso de producirse un endurecimiento de la zona pelúcida a causa de la vitrificación, la salida del embrión no va a ser posible, o va a estar dificultada. Adicionalmente, la realización del colapso asistido previo a la vitrificación incrementa la probabilidad de supervivencia posterior (Kovačič *et al.*, 2022), por tanto, en las ocasiones en las que se deba realizar una segunda vitrificación, se estaría incrementando también la probabilidad de éxito a la supervivencia. Por otra parte, habría que modificar los protocolos actuales de vitrificación para intentar mejorar los resultados de FIV después de dos vitrificaciones. Algunos de los factores que podrían ser modificados son los tiempos de exposición a los crioprotectores (Gallardo *et al.*, 2019), la composición y concentración de estos o, por ejemplo, la incorporación de antioxidantes en los medios de vitrificación (Truong and Gardner, 2020). De cara al futuro, se podrían integrar y desarrollar nuevas tecnologías automatizadas de vitrificación que mejoren el procedimiento y, con ello, los resultados finales. Además, la inteligencia artificial podría ser utilizada como apoyo ya que podría ayudar a clasificar la probabilidad de éxito de los embriones a las dobles vitrificaciones.

6. CONCLUSIONES

1. La criopreservación múltiple afecta negativamente a los embriones, independientemente de si han sido biopsiados o no y, por tanto, induce una reducción de la tasa de éxito de los resultados de la FIV.
2. La doble vitrificación de embriones, independientemente del estadio de desarrollo embrionario en el que se lleven a cabo, influye negativamente en los resultados de los ciclos de FIV. Sin embargo, no modifica notablemente la tasa de supervivencia del embrión.
3. La revitrificación de embriones, cuya primera vitrificación tuvo lugar en ovocito, incrementa la tasa de aborto espontáneo y reduce la probabilidad de embarazo y RNV.

7. REFERENCIAS

- Aizer, A., Noach-Hirsh, M., Dratviman-Storobinsky, O., Haas, J. and Orvieto, R. (2020) "Does the number of embryos loaded on a single cryo-carrier affect post-vitrification survival rate?", *Zygote*. Cambridge University Press. doi:10.1017/S0967199420000453.
- Alan Trounson and Linda Mohr (1983) "Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo", *Nature*, 305.
- Alteri, A., Reschini, M., Guarneri, C., Bandini, V., Bertapelle, G., Pinna, M., Rabellotti, E., Ferrari, S., Papaleo, E., Paffoni, A., Vigano', P. and Somigliana, E. (2024) "The effect of laser assisted hatching on vitrified/warmed blastocysts: the ALADDIN randomized controlled trial", *Fertility and Sterility*. Elsevier BV. doi:10.1016/j.fertnstert.2024.02.010.
- Aluko, A., Vaughan, D. A., Modest, A. M., Penzias, A. S., Hacker, M. R., Thornton, K. and Sakkas, D. (2021) "Multiple cryopreservation–warming cycles, coupled with blastocyst biopsy, negatively affect IVF outcomes", *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier Ltd, 42(3), pp. 572–578. doi:10.1016/j.rbmo.2020.11.019.
- Avella, M. A., Milne, K. A., Dawood, S., Dawood, A. and Tucker, M. J. (2019) "Assisted hatching of human embryos for successful implantation", in *In Vitro Fertilization*. Cham: Springer International Publishing, pp. 567–579. doi:10.1007/978-3-319-43011-9_46.
- Bourdon, M., Maignien, C., Pocate-Cheriet, K., Plu Bureau, G., Marcellin, L., Patrat, C., Chapron, C. and Santulli, P. (2021) "The freeze-all strategy after IVF: which indications?", *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier Ltd, pp. 529–545. doi:10.1016/j.rbmo.2020.11.013.
- Boyard, J., Reignier, A., Chtourou, S., Lefebvre, T., Barrière, P. and Fréour, T. (2022) "Should artificial shrinkage be performed prior to blastocyst vitrification? A systematic review of the literature and meta-analysis", *Human Fertility*. Taylor and Francis Ltd., 25(1), pp. 24–32. doi:10.1080/14647273.2019.1701205.
- Brouillet, S., Gala, A., Barry, F., Anav, M., Ferrieres-Hoa, A., Andreeva, A., Molinari, N., Gaspari, L., Loup, V., Anahory, T. and Hamamah, S. (2024) "Artificial shrinkage before fresh blastocyst transfer and in vitro fertilization outcomes: a pilot randomized controlled study", *Reproductive BioMedicine Online*, p. 103941. doi:10.1016/j.rbmo.2024.103941.
- Casciani, V., Monseur, B., Cimadomo, D., Alvero, R. and Rienzi, L. (2023) "Oocyte and embryo cryopreservation in assisted reproductive technology: past achievements and current challenges", *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 120(3), pp. 506–520. doi:10.1016/j.fertnstert.2023.06.005.
- Celada, P. and Bosch, E. (2020) "Freeze-all, for whom, when, and how", *Upsala Journal of Medical Sciences*. Taylor and Francis Ltd, pp. 104–111. doi:10.1080/03009734.2020.1746870.
- Chen, H., Zhang, L., Meng, L., Liang, L. and Zhang, C. (2022) "Advantages of vitrification preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes", *Clinical Epigenetics*. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/s13148-022-01355-y.
- Cimadomo, D., Marconetto, A., Trio, S., Chiappetta, V., Innocenti, F., Albricci, L., Erlich, I., Ben-Meir, A., Har-Vardi, I., Kantor, B., Sakov, A., Coticchio, G., Borini, A., Ubaldi, F. M. and Rienzi, L. (2022) "Human blastocyst spontaneous collapse is associated with worse morphological quality and higher degeneration and

- aneuploidy rates: a comprehensive analysis standardized through artificial intelligence", *Human Reproduction*. Oxford University Press, 37(10), pp. 2291–2306. doi:10.1093/humrep/deac175.
- Cobo, A., Castellò, D., Vallejo, B., Albert, C., De Los Santos, J. M. and Remohí, J. (2013) "Outcome of cryotransfer of embryos developed from vitrified oocytes: Double vitrification has no impact on delivery rates", *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 99(6). doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.106.
- Dallagiovanna, C., Vanni, V. S., Somigliana, E., Busnelli, A., Papaleo, E., Villanacci, R., Candiani, M. and Reschini, M. (2021) "Risk factors for monozygotic twins in IVF-ICSI cycles: a case-control study", *Reproductive Science*, 28, pp. 1421–1427. doi:10.1007/s43032-020-00406-0/Published.
- Darwish, E. and Magdi, Y. (2016) "Artificial shrinkage of blastocoel using a laser pulse prior to vitrification improves clinical outcome", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Springer New York LLC, 33(4), pp. 467–471. doi:10.1007/s10815-016-0662-z.
- Eftekhari, M., Mohammadi, B., Tabibnejad, N. and Mortazavi Lahijani, M. (2020) "Frozen-thawed cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in high responder patients", *Zygote*. Cambridge University Press. doi:10.1017/S0967199420000428.
- Endo, Y., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Fujii, Y. and Motoyama, H. (2021) "Laser-assisted hatching on clinical and neonatal outcomes in patients undergoing single vitrified blastocyst transfer: A propensity score-matched study", *Reproductive Medicine and Biology*. John Wiley and Sons Ltd, 20(2), pp. 182–189. doi:10.1002/rmb2.12366.
- Estudillo, E., Jiménez, A., Bustamante-Nieves, P. E., Palacios-Reyes, C., Velasco, I. and López-Ornelas, A. (2021) "Cryopreservation of gametes and embryos and their molecular changes", *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI. doi:10.3390/ijms221910864.
- Gallardo, M., Saenz, J. and Risco, R. (2019) "Human oocytes and zygotes are ready for ultra-fast vitrification after 2 minutes of exposure to standard CPA solutions", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-52014-x.
- Han, E. J., Park, J. K., Eum, J. H., Bang, S., Kim, J. W. and Lee, W. S. (2024) "Spontaneously hatching human blastocyst is associated with high development potential and live birth rate in vitrified-warmed single blastocyst transfer: A retrospective cohort study", *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. John Wiley and Sons Ltd, 164(1), pp. 315–323. doi:10.1002/ijgo.15084.
- Huang, Y., Cheng, Y., Zhang, M., Chen, Y., Zhou, R., Lin, D. and Guo, X. (2024) "Effect of repeated vitrification of human embryos on pregnancy and neonatal outcomes", *Journal of Ovarian Research*. BioMed Central Ltd, 17(1). doi:10.1186/s13048-024-01370-y.
- Joaquim, D. C., Borges, E. D., Viana, I. G. R., Navarro, P. A. and Vireque, A. A. (2017) "Risk of contamination of gametes and embryos during cryopreservation and measures to prevent cross-contamination", *BioMed Research International*. Hindawi Limited. doi:10.1155/2017/1840417.
- Kamel-Mohamed, M., El-Noury, M. A. H., Amer, M. K., Fakhry, E. and Alalfy, M. (2022) "Comparative study between two techniques for artificial shrinkage of blastocysts prior to vitrification: laser pulse versus micro-needle technique in

- increasing chemical, clinical pregnancy and live birth rates after ICSI, a randomized controlled trial", *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. Taylor and Francis Ltd., 35(25), pp. 4910–4917. doi:10.1080/14767058.2021.1873265.
- Kovačić, B., Taborin, M., Vlaisavljević, V., Reljić, M. and Knez, J. (2022) "To collapse or not to collapse blastocysts before vitrification? A matched case-control study on single vitrified-warmed blastocyst transfers", *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier Ltd, 45(4), pp. 669–678. doi:10.1016/j.rbmo.2022.03.030.
- Lacey, L., Hassan, S., Franik, S., Seif, M. W. and Akhtar, M. A. (2021) "Assisted hatching on assisted conception (in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI))", *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd, 2021(3). doi:10.1002/14651858.CD001894.pub6.
- Lafuente-Funes, S. (2023) "The role of vitrification in spanish reproductive labs: A cryo-revolution led by strategic freezing", *Science Technology and Human Values*. SAGE Publications Inc., 48(4), pp. 752–776. doi:10.1177/01622439231155649.
- Li, X., Li, W., Jia, H., Gao, Y., Shi, W. and Bai, H. (2023) "Double vitrification–warming cycles, coupled with blastocyst biopsy, impair live birth but do not affect neonatal outcomes", *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. John Wiley and Sons Ltd, 160(3), pp. 806–813. doi:10.1002/ijgo.14355.
- Liebermann, J., Hrvojevic, K., Hirshfeld-Cytron, J., Brohammer, R., Wagner, Y., Susralski, A., Jasulaitis, S., Chan, S., Takhsh, E. and Uhler, M. (2024) "Fast and furious: pregnancy outcome with one-step rehydration in the warming protocol for human blastocysts", *Reproductive BioMedicine Online*, 48, p. 103731. doi:10.1016/j.
- Liu, Y., Chen, J. and Chian, R.-C. (2023) "Beyond survival effects of vitrification-warming on epigenetic modification and maternal transcripts of oocytes", in *Embryology Update*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.107073.
- Liu, Y., Jones, C. and Coward, K. (2022) "The current practice of assisted hatching for embryos in fertility centres: a general survey", *Reproductive Sciences*. Institute for Ionics, 29(9), pp. 2664–2673. doi:10.1007/s43032-022-00931-0.
- Loutradi, K. E., Kolibianakis, E. M., Venetis, C. A., Papanikolaou, E. G., Pados, G., Bontis, I. and Tarlatzis, B. C. (2008) "Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis", *Fertility and Sterility*, 90(1), pp. 186–193. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.010.
- Lu, X., Liu, Y., Cao, X., Liu, S. Y. and Dong, X. (2019) "Laser-assisted hatching and clinical outcomes in frozen-thawed cleavage-embryo transfers of patients with previous repeated failure", *Lasers in Medical Science*. Springer London, 34(6), pp. 1137–1145. doi:10.1007/s10103-018-02702-3.
- Makieva, S., Sachs, M. K., Xie, M., Velasco, A., El-Hadad, S., Kalaitzopoulos, D. R., Dedes, I., Stiller, R. and Leeners, B. (2023) "Double vitrification and warming does not compromise the chance of live birth after single unbiopsied blastocyst transfer", *Human Reproduction Open*. Oxford University Press, 2023(4). doi:10.1093/hropen/hoad037.
- Manns, J., Patrick, J. L., Katz, I., Holt, T., Katz, S. L. and Taylor, T. H. (2022) "Clinical validation of a new, ultrafast warming protocol, resulting in equivalent implantation rates and significant time savings versus routine warming protocol, a prospective randomized control", *Fertility and Sterility*. Elsevier BV, 118(5), p. e7. doi:10.1016/j.fertnstert.2022.09.227.

- Michailov, Y., Friedler, S. and Saar-Ryss, B. (2023) "Methods to improve frozen-thawed blastocyst transfer outcomes- the IVF laboratory perspective", *Journal of IVF-Worldwide*. SAABRON PRESS, 1(1–3). doi:10.46989/001c.87541.
- Mizobe, Y., Kuwatsuru, Y., Kuroki, Y., Fukumoto, Y., Tokudome, M., Moewaki, H., Watanabe, M., Tabira, T., Iwakawa, T. and Takeuchi, K. (2021) "The effect of repeated cryopreservation and thawing using cryotip on the clinical outcomes of embryos", *Reproductive Medicine and Biology*. John Wiley and Sons Ltd, 20(2), pp. 176–181. doi:10.1002/rmb2.12365.
- Nagy, Z. P., Shapiro, D. and Chang, C. C. (2020) "Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer in vitro fertilization treatment", *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., pp. 241–247. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.12.009.
- Nanassy, L., Schoepper, B., Schultze-Mosgau, A., Depenbusch, M., Eggersmann, T. K., Hiller, R. A. F. and Griesinger, G. (2023) "Evaluation of live birth rates and perinatal outcomes following two sequential vitrification/warming events at the zygote and blastocyst stages", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Springer, 40(10), pp. 2357–2365. doi:10.1007/s10815-023-02909-6.
- Oraiopoulou, C., Karagianni, M., Papatheodorou, A., Toumpa, O., Papadopoulou, M., Christophoridis, N., Drakopoulos, P. and Chatziparasidou, A. (2024) "Double vitrification of embryos adversely affects clinical outcomes", *JBRA Assisted Reproduction*. doi:10.5935/1518-0557.20240014.
- Osman, E., Franasiak, J. and Scott, R. (2018) "Oocyte and embryo manipulation and epigenetics", *Seminars in reproductive medicine*. NLM (Medline). doi:10.1055/s-0039-1688801.
- Ostler, T., Woolley, T. E., Swann, K., Thomson, A., Priddle, H., Palmer, G. and Kaouri, K. (2021) "Vitrifying multiple embryos in different arrangements does not alter the cooling rate", *Cryobiology*. Academic Press Inc., 103, pp. 22–31. doi:10.1016/j.cryobiol.2021.10.001.
- Quintans, C. J., Donaldson, M. J., Bertolino, M. V. and Pasqualini, R. S. (2003) "Birth resulting from transfer of blastocysts cryopreserved with propanediol after spontaneous hatching", *Reproductive BioMedicine Online*. Reproductive Healthcare Ltd, 6(1), pp. 66–68. doi:10.1016/S1472-6483(10)62057-3.
- Ramadan, H., Pakrashi, T., Thurman, A. R., Pomeroy, K. O. and Celia, G. (2022) "Cryopreservation does not affect the clinical pregnancy rate of blastocysts derived from vitrified oocytes", *Scientific Reports*. Nature Research, 12(1). doi:10.1038/s41598-022-12992-x.
- Sciorio, R., Manna, C., Fauque, P. and Rinaudo, P. (2023) "Can cryopreservation in assisted reproductive technology (ART) induce epigenetic changes to gametes and embryos?", *Journal of Clinical Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). doi:10.3390/jcm12134444.
- SEF (2021) *Registro Nacional de Actividad 2021. Registro SEF*.
- Singh, A., Rappolee, D. A. and Ruden, D. M. (2023) "Epigenetic reprogramming in mice and humans: From fertilization to primordial germ cell development.", *Cells*, 12(14). doi:10.3390/cells12141874.
- Smallwood, S. A. and Kelsey, G. (2012) "De novo DNA methylation: a germ cell perspective", *Trends in Genetics*, 28(1), pp. 33–42. doi:10.1016/j.tig.2011.09.004.
- Theodorou, E., Jones, B. P., Cardenas Armas, D. F., Heath, C., Serhal, P. and Ben-Nagi, J. (2022) "Live birth rate following a euploid blastocyst transfer is not affected by double vitrification and warming at cleavage or blastocyst stage", *Journal of*

- Assisted Reproduction and Genetics*. Springer, 39(4), pp. 987–993. doi:10.1007/s10815-022-02440-0.
- Trounson, A., Anita Peura, P. and Kirby, C. (1987) "Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation", *Fertility and Sterility*, 48(5).
- Truong, T. T. and Gardner, D. K. (2020) "Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification", *Human Reproduction*, 35(1), pp. 12–23. doi:10.1093/humrep/dez243.
- Vajta, G., Rienzi, L. and Ubaldi, F. M. (2015) "Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos", *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier Ltd, pp. 325–333. doi:10.1016/j.rbmo.2014.12.012.
- Venetis, C., Keller, E. and Chambers, G. M. (2023) "Freeze-all embryos during treatment with assisted reproduction: Health economic aspects", *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Bailliere Tindall Ltd. doi:10.1016/j.bpobgyn.2022.102303.
- Wang, M., Jiang, J., Xi, Q., Li, D., Ren, X., Li, Z., Zhu, L. and Jin, L. (2021) "Repeated cryopreservation process impairs embryo implantation potential but does not affect neonatal outcomes", *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier Ltd, 42(1), pp. 75–82. doi:10.1016/j.rbmo.2020.11.007.
- Wang, X., Mao, R., Wang, M., Long, R., Jin, L. and Zhu, L. (2023) "The effect of recryopreservation on embryo viability and outcomes of in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis", *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., pp. 321–332. doi:10.1016/j.fertnstert.2023.03.001.
- Wang, Y., Chen, C., Liang, J., Fan, L., Liu, D., Zhang, X. and Liu, F. (2023) "A comparison of the clinical effects of thinning and drilling on laser-assisted hatching". doi:10.1007/s10103-020-03230-9/Published.
- Wiltshire, A., Schaal, R., Wang, F., Tsou, T., McKerrow, W. and Keefe, D. (2023) "Vitrification with dimethyl sulfoxide induces transcriptomic alteration of gene and transposable element expression in immature human oocytes", *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 14(6). doi:10.3390/genes14061232.
- Yurchuk, T., Petrushko, M. and Fuller, B. (2018) "Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars", *Early Human Development*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 6–9. doi:10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016.
- Zech, N. H., Lejeune, B., Zech, H. and Vanderzwalmen, P. (2005) "Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: Effect of an opening in the zona pellucida before vitrification", *Reproductive BioMedicine Online*. Reproductive Healthcare Ltd, 11(3), pp. 355–361. doi:10.1016/S1472-6483(10)60844-9.
- Zeilmaker, G. H., Alberda, A. T., van Gent, I., Rijkmans, C. M. and Drogendijk, A. C. (1984) "Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos", *Fertility and Sterility*, 42(2), pp. 293–296. doi:10.1016/S0015-0282(16)48029-5.
- Zhang, Q., Yu, W., Jin, C., Ni, T., Zhou, T., Zhao, Q., Wang, W., Li, Y. and Yan, J. (2023) "Impact of multiple vitrification-warming procedures and insemination methods on pregnancy and neonatal outcomes in preimplantation genetic testing for aneuploidy", *Reproductive Sciences*. Institute for Ionics, 30(7), pp. 2302–2312. doi:10.1007/s43032-023-01177-0.