

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**en**

**Biología y Tecnología Aplicada a  
la Reproducción Humana Asistida**

**INCORPORACIÓN DE LA  
VITRIFICACIÓN Y  
DESVITRIFICACIÓN ULTRARRÁPIDA  
DE OVOCITOS Y EMBRIONES EN LOS  
CENTROS DE REPRODUCCIÓN  
ASISTIDA**

**Autor:** María López Zapatero

**Tutor:** Vicente Badajoz Liébana

**Alcobendas, Septiembre 2025**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.</b>	3
<b>ABSTRACT AND KEY WORDS.</b>	4
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS.</b>	5
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	6
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.	6
1.2 PRINCIPIOS GENERALES DE LA CRIOPRESERVACIÓN.	7
1.2.1 CONGELACIÓN LENTA.	8
1.2.2 VITRIFICACIÓN.	8
1.2.3 DAÑOS ASOCIADOS A LA CRIOPRESERVACIÓN.	9
1.3.1 ¿QUÉ ES LA VITRIFICACIÓN ULTRARRÁPIDA (UF-VIT)?	10
1.3.2 ¿QUÉ ES LA DESVITRIFICACIÓN ULTRARRÁPIDA (RE)?	13
<b>2. OBJETIVOS.</b>	14
<b>3. MÉTODOS.</b>	15
<b>4. RESULTADOS.</b>	16
4.1 UF-VIT EN OVOCITOS.	16
4.1.1 VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO DE UF-VIT EN OVOCITOS EN FASE DE VESÍCULA GERMINAL (VG).	16
4.1.2 DESARROLLO DE EMBRIONES A PARTIR DE OVOCITOS TRATADOS CON UF-VIT.	19
4.1.3 EFECTOS DE LA UF-VIT EN LOS ORGÁNULOS OVOCITARIOS.	23
4.2 UF-VIT EN EMBRIONES.	24
4.3 APLICACIÓN DE LA RE EN OVOCITOS Y EMBRIONES HUMANOS.	25
4.3.1 RE EN OVOCITOS.	25
4.3.2 RE EN EMBRIONES.	26
<b>5. ARGUMENTACIÓN CRÍTICA.</b>	27
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	33
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	34

## RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.

La vitrificación se ha consolidado como el método de criopreservación más extendido a nivel mundial, aunque sigue presentando como principal limitación la toxicidad celular derivada de la elevada concentración de agentes crioprotectores (ACPs). En este contexto, han surgido protocolos de equilibrado y rehidratación en un solo paso, conocidos como vitrificación y desvitrificación ultrarrápida (UF-VIT y RE, respectivamente), cuyo objetivo se centra en reducir el tiempo de exposición a los ACPs, lo que además mejoraría la dinámica de trabajo en los laboratorios de reproducción asistida.

A diferencia de la vitrificación convencional (C-VIT), que implica sucesivos ciclos de contracción y expansión celular, la UF-VIT se basa en un único ciclo de contracción, antes de proceder directamente a la vitrificación. Este mecanismo simplificado reduce el estrés osmótico, preserva mejor la integridad celular y acorta significativamente el tiempo del procedimiento, un aspecto muy relevante dado que las transferencias de embriones congelados (FET) representan más del 35% de los tratamientos de reproducción asistida (TRA) a nivel mundial y la preservación de ovocitos es una de las técnicas más demandadas en los laboratorios de TRA.

Diversos estudios han validado la eficacia de la combinación de la UF-VIT y la RE en ovocitos y embriones, mostrando mejoras en diversos parámetros de interés, entre los que se incluye tasas de supervivencia, de implantación o tasas de embarazo en curso. En conjunto, la evidencia sugiere que los protocolos de UF-VIT y RE representan una alternativa prometedora para superar las limitaciones de la vitrificación y desvitrificación convencional, mejorando la seguridad y eficiencia del proceso.

**Palabras clave:** criopreservación, vitrificación y desvitrificación ultrarrápida, ovocitos, embriones, agentes crioprotectores, toxicidad, alternativa.

## ABSTRACT AND KEY WORDS.

Vitrification has become established as the most widely used cryopreservation method, although its main limitation remains the cellular toxicity derived from the high concentration of cryoprotective agents (CPAs). In this context, single-step equilibration and rehydration protocols have emerged, known as ultra-fast vitrification (UF-VIT) and rapid elution (RE), whose objective is to reduce exposure time to CPAs, minimizing toxicity and osmotic stress derived from them, which would also improve work dynamics in assisted reproduction laboratories.

Unlike conventional vitrification (C-VIT), which involves successive cycles of cell contraction and expansion, UF-VIT is based on a single contraction cycle before proceeding directly to vitrification. This simplified mechanism reduces osmotic stress, better preserves cell integrity and significantly shortens the duration of the procedure, a very important aspect given that frozen embryo transfers (FET) account more than 35% of assisted reproduction treatments (ART) worldwide and oocyte preservation is one of the most sought-after techniques in ART laboratories.

Several studies have validated the efficacy of combining UF-VIT and RE in oocytes and embryos, showing improvements in various parameters of interest, including survival, implantation and ongoing pregnancy rates. Altogether, the evidence suggests that the UF-VIT and RE represent a promising alternative to overcome the limitations of conventional vitrification and warming protocols, enhancing both the safety and efficiency of cryopreservation.

**Key words:** criopreservation, ultra-fast vitrification, rapid elution, oocytes, embryos, cryoprotective agents, toxicity, alternative.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

**ACPs:** agentes crioprotectores.

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**RNV:** recién nacido vivo.

**EG:** etilenglicol.

**PBS:** solución tampón de fosfato alcalino.

**EP:** protocolo de equilibrado.

**UF-VIT:** vitrificación ultrarrápida.

**C-VIT:** vitrificación convencional.

**CD:** desvitrificación convencional.

**RE:** desvitrificación ultrarrápida (del inglés, *rapid elution*).

**nVS:** solución no vitrificante.

**VS:** solución vitrificante.

**M-I:** metafase I.

**M-II:** metafase II.

**DP:** protocolo de deshidratación.

**ZP:** zona pelúcida.

**VG:** vesícula germinal.

**MT:** mitocondrias.

**AOA:** activación artificial ovocitaria.

**IVM:** maduración in vitro.

**FET:** transferencia de embriones congelados.

**PGT:** test genético preimplantacional.

**ES:** solución de equilibrado.

**WS:** solución de lavado.

**TS:** solución de desvitrificación.

**TRA:** tratamientos de reproducción asistida.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

El desarrollo de las técnicas de vitrificación de ovocitos y embriones ha supuesto una auténtica revolución para la medicina reproductiva. No obstante, el camino para llegar a su aplicación clínica fue complejo, largo y marcadamente distinto para cada tipo celular. Esto se debe a que la criopreservación embrionaria se consolidó de una forma más temprana, exitosa y reproducible que la de ovocitos, ya que las propiedades morfológicas y fisiológicas de los mismos supusieron un gran reto frente a los agentes crioprotectores (ACPs).

A partir de mediados del siglo XX se puede destacar la labor de Luyet (1937), quien realizó los primeros avances en criobiología. Se encargó de señalar la relevancia de la ausencia de hielo para mantener la viabilidad celular. Sin embargo, la vitrificación tardó muchos años en ser aceptada como una estrategia práctica en criopreservación debido a la dificultad para reproducir los resultados obtenidos y a la toxicidad química derivada de las altas concentraciones de ACPs requeridas para aplicar la técnica (1). Seguidamente, Polge y sus colaboradores, en 1949, descubrieron las propiedades crioprotectoras del glicerol, dando lugar a los primeros protocolos de congelación lenta (2).

En 1972, Whittingham et al. demostraron por primera vez la viabilidad de embriones de ratón tras criopreservación lenta con dimetilsulfóxido (DMSO). En los siguientes años, se congelaron exitosamente numerosos gametos de distintas especies, lo que llevó a que en 1983 se publicara en Nature el primer embarazo tras la transferencia de un embrión humano que había sido previamente vitrificado. A pesar de eso, el embarazo no llegó a término y fue en 1984 cuando se obtuvo el primer recién nacido vivo (RNV) procedente de la criopreservación lenta, que ya había sido estandarizada. Se siguió trabajando con el objetivo de buscar mejores resultados y se comenzaron a desarrollar nuevos protocolos de vitrificación rápida, la cual se aplicó por primera vez en gametos humanos en 1998 (1,3,4).

En el caso de los ovocitos, el proceso de estandarización fue más complejo. Pese a los primeros intentos utilizando glicerol como ACP entre 1950 y 1970, los resultados fueron negativos debido a la extrema sensibilidad del ovocito a los cambios osmóticos

y térmicos pues se trata de una célula de gran tamaño, con elevado contenido de agua y una relación área/volumen muy pequeño. No fue hasta unos años más tarde, en 1986, cuando se registró el primer RNV a partir de ovocitos humanos vitrificados con etilenglicol (EG) y sacarosa. Sin embargo, las tasas de embarazo y supervivencia siguieron siendo bajas hasta la aparición, en los años 2000, de dispositivos de mínimo volumen como el sistema Cryotop y medios optimizados. Estos avances mejoraron significativamente los resultados clínicos, y en 2013, la American Society for Reproductive Medicine (ASRM) reconoció la vitrificación de ovocitos como una técnica segura y eficaz, eliminando su carácter experimental (5,6).

Con todo ello, ahora mismo la vitrificación es sin duda el método estandarizado en los laboratorios de reproducción asistida para la criopreservación de ovocitos y embriones. Sin embargo, la búsqueda de nuevos protocolos hace que emerja el estudio de la vitrificación ultrarrápida, una manera más sencilla de vitrificación que hoy en día aún se encuentra a falta de estandarizar (7).

## **1.2 PRINCIPIOS GENERALES DE LA CRIOPRESERVACIÓN.**

Pese a la existencia de diversas estrategias de vitrificación, todas comparten los mismos principios físico-químicos.

En términos generales, la criopreservación se basa en una deshidratación celular dada por la exposición a un ACP a muy bajas temperaturas. El éxito de la congelación dependerá básicamente de una adecuada velocidad de enfriamiento y exposición a los ACPs, con el objetivo de evitar la formación de cristales intracelulares. La principal función de los ACPs reside en favorecer esta rápida deshidratación celular y contrarrestar los posibles efectos nocivos derivados de la elevada concentración de solutos en el interior de la célula u organismo a preservar, ya que no cristalizan, sino que se solidifican en forma de estructura vítrea.

Los ACPs se clasifican en penetrantes y no penetrantes, según su capacidad para atravesar la membrana celular. Los ACPs penetrantes son sustancias de bajo peso molecular, que pueden atravesar la membrana celular y sustituir el agua intracelular, promoviendo así la deshidratación de la célula. Entre los agentes crioprotectores penetrantes más utilizados se encuentran el 1,2-propanodiol, el dimetilsulfóxido

(DMSO), el etilenglicol (EG) y el glicerol. Por otro lado, los crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular. Estas generan un gradiente osmótico que favorece la salida de agua hacia el medio extracelular, lo que favorece la deshidratación de la célula (3,8).

### **1.2.1 CONGELACIÓN LENTA.**

Para llevar a cabo este procedimiento, se emplean ACPs de forma progresiva en concentraciones relativamente bajas y se aplican velocidades de enfriamiento muy lentas (2 °C/minuto) en congeladores programables. Este enfoque permite un intercambio gradual de agua entre los compartimentos intra y extracelular, lo que minimiza los posibles daños osmóticos (4).

La congelación lenta es un método que ha quedado prácticamente desplazado en la práctica clínica, debido a la introducción de la vitrificación. Diversos estudios han demostrado que la vitrificación de ovocitos, en comparación con la congelación lenta, mejora significativamente la tasa de supervivencia ovocitaria y probablemente incrementa las tasas de embarazo clínico en mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida. (8).

### **1.2.2 VITRIFICACIÓN.**

La vitrificación es el método de criopreservación que ha sido consolidado por excelencia en la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida. A diferencia de la congelación lenta, se trata de una rápida deshidratación celular inducida por la exposición a un medio de congelación hiperosmolar y una elevada velocidad de enfriamiento. Otra de las diferencias con la congelación lenta es que, aparte de que el protocolo requiere de menos tiempo, se elimina por completo la formación de cristales de hielo, tanto en el medio intra como extracelular. Este hecho ocurre porque cuando una solución altamente concentrada en solutos se somete a un enfriamiento extremadamente rápido, por debajo de su punto de fusión, se produce un gran aumento de la viscosidad, inmovilizando las moléculas y transformando la solución de un estado líquido a uno sólido de aspecto vítreo, evitando la formación de cristales de hielo.



Durante el proceso, el agua es sustituida por los ACPs y la célula se somete a un descenso brusco de temperatura, desde valores ambiente hasta  $-196^{\circ}\text{C}$ . Esta rápida transición térmica impide la formación de cristales de hielo, preservando así la integridad celular y tisular.

Pese a que la vitrificación es una técnica sencilla, rápida y muy efectiva, presenta dos principales inconvenientes: la toxicidad asociada al uso de altas concentraciones de ACPs (4-8M) y el peligro de la aparición de cristales durante la fase de calentamiento, si no se aplican velocidades suficientemente elevadas. Con el propósito disminuir el volumen de ACP a la hora de la vitrificación, se han desarrollado diversos soportes específicos para la carga celular que utilizan un volumen mínimo (aproximadamente 1  $\mu\text{l}$ ) de solución de vitrificación. De este modo, se disminuye el riesgo de generar toxicidad celular. El dispositivo más extendido por los laboratorios de reproducción asistida es el Cryotop, una fina lengüeta de polipropileno unida a un mango de plástico, que incorpora un protector diseñado para cubrirla y garantizar la seguridad de las muestras durante su almacenamiento (8).

### 1.2.3 DAÑOS ASOCIADOS A LA CRIOPRESERVACIÓN.

Aunque la vitrificación es una herramienta fundamental en los laboratorios de reproducción asistida, requiere de un gran control y manejo sobre los protocolos para generar el mínimo daño posible a la célula. Tanto en ovocitos como en embriones, se han documentado diversos tipos de daño estructural y funcional derivados principalmente de dos mecanismos: la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico (8,9).

- **Daños a nivel de la membrana plasmática.**

Las membranas celulares son especialmente sensibles al descenso de temperatura. Durante el proceso de vitrificación, los lípidos de la membrana sufren una transición de estado de fluido a sólido, perdiendo su integridad y flexibilidad. Si la deshidratación celular es excesiva, puede superar la resistencia de la membrana, lo que provoca alteraciones irreversibles en su permeabilidad (10).

- **Daños citoplasmáticos y mitocondriales.**

Los cambios de volumen durante el enfriamiento afectan al citoesqueleto, provocando desorganización de microfilamentos y una distribución anómala de las mitocondrias.

Esto puede traducirse en una disminución de la producción de ATP y, por ende, en una reducción de la competencia ovocitaria y del desarrollo embrionario temprano.

- **Alteraciones en la zona pelúcida (ZP).**

La exposición a ACPs puede desencadenar incrementos transitorios de calcio intracelular, que estimulan la exocitosis de gránulos corticales y provocan un endurecimiento prematuro de la zona pelúcida, afectando negativamente a la fecundación.

- **Alteraciones del huso meiótico.**

El huso meiótico, fundamental para la correcta segregación cromosómica, es extremadamente sensible al frío. La vitrificación puede inducir su desorganización o desaparición temporal. Es por ello por lo que su alteración puede comprometer la división celular y la migración de los pronúcleos.

- **Modificaciones de la expresión génica y epigenética.**

La criopreservación puede alterar la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, la apoptosis y el ciclo celular. Estas modificaciones afectan a la viabilidad del embrión, especialmente si se altera la reserva de ARN mensajero del ovocito. Asimismo, se han observado cambios en los patrones de metilación de ADN en embriones vitrificados, con posibles consecuencias epigenéticas, aunque los resultados son todavía contradictorios.

- **Formación de hielo y criofracturas.**

La recristalización puede generar cristales de hielo relativamente grandes, que dañan las estructuras celulares. La magnitud del daño dependerá del tamaño de los cristales generados (10). Además, se pueden producir criofracturas mecánicas por tensiones durante el cambio de fase, especialmente si el medio de suspensión se expande de forma no uniforme (9).

## **1.3 VITRIFICACIÓN Y DESVITRIFICACIÓN ULTRARRÁPIDA: AVANCES Y FUNDAMENTOS.**

### **1.3.1 ¿QUÉ ES LA VITRIFICACIÓN ULTRARRÁPIDA (UF-VIT)?**

Ante los desafíos que aún persisten en la criopreservación, resulta imprescindible replantear los enfoques existentes y avanzar hacia estrategias que permitan minimizar el estrés celular y reducir la variabilidad de la técnica. En este

contexto, la vitrificación ultrarrápida (UF-VIT) surge como una alternativa prometedora para optimizar la criopreservación de ovocitos y embriones en los centros de reproducción asistida (11,12).

La UF-VIT reduce el tiempo de exposición a la solución de equilibrado en comparación con la vitrificación convencional (C-VIT). Este enfoque permite evitar la fase de equilibrio osmótico típica de la etapa de exposición a soluciones (ES), lo que reduce el estrés celular asociado. Mediante esta técnica se ha logrado una vitrificación altamente eficiente, con resultados favorables tanto en modelos murinos como en humanos. Es relevante destacar que, tiempos de exposición excesivamente breves en la fase de equilibrado, pueden afectar negativamente a la supervivencia y el desarrollo de los ovocitos equilibrados. Además, la literatura disponible sobre la UF-VIT es aún limitada y su aplicabilidad en contextos clínicos es aún restringida. Esto pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios adicionales en ovocitos y embriones humanos que generen evidencia sólida y trasladable a la práctica clínica. No obstante, la investigación en este ámbito se enfrenta a importantes limitaciones, derivadas tanto de la complejidad y el carácter invasivo de los procedimientos implicados, como de las consideraciones éticas que conlleva el uso de gametos humanos (7,13).

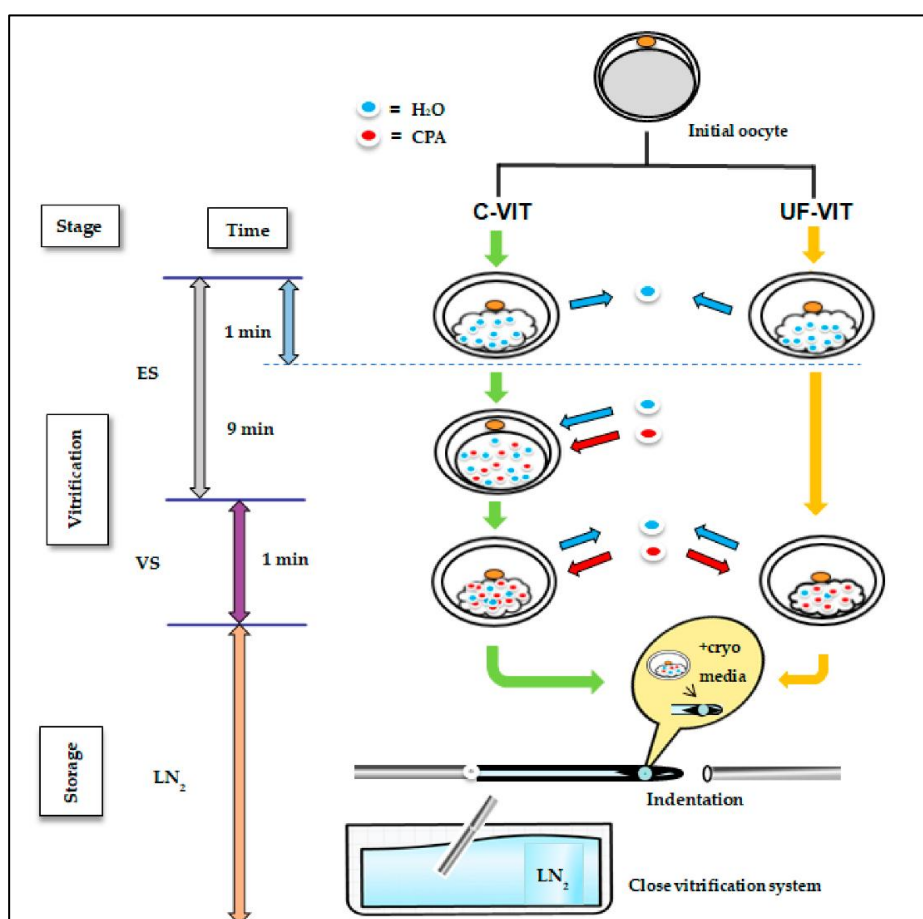
- **PROTOCOLOS EMERGENTES Y DIFERENCIA CON LA VITRIFICACIÓN CONVENCIONAL.**

El protocolo de equilibrado (EP) representa la práctica estándar actual para preparar a los ovocitos humanos en metafase II (M-II) para su vitrificación. Consiste en exponer directamente los ovocitos durante 10 minutos a una solución tampón de fosfato alcalino (PBS) que contiene un 7,5 % v/v de EG y un 7,5 % v/v de dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO), denominada solución no vitrificante (nVS). Este paso tiene como objetivo permitir una entrada progresiva de los crioprotectores al interior de la célula, al tiempo que comienza un proceso de deshidratación parcial mediante la salida de agua por ósmosis. Es fundamental para minimizar el choque osmótico y el estrés celular, ya que prepara al ovocito o embrión para tolerar la exposición posterior a la solución vitrificante (VS), que contiene concentraciones más elevadas de crioprotectores y sacarosa. Posteriormente, se realiza una exposición directa de 1 minuto a la VS, una solución más concentrada que vitrifica al enfriarse a altas velocidades. Dado que esta exposición es muy breve, no hay tiempo suficiente para que

las células alcancen el equilibrio osmótico, por lo que se encogen, se deshidratan aún más y se impregnan de crioprotectores. Está compuesta por PBS con un 15 % v/v de EG, 15 % v/v de Me<sub>2</sub>SO y 0,5 M de sacarosa.

En contraste, el protocolo de deshidratación (DP), que caracteriza a la UF-VIT, constituye una modificación del protocolo de equilibrado, donde el tiempo de exposición de los ovocitos, tanto a la solución nVS como a la VS, se reduce a 1 minuto en cada caso, utilizando un volumen de 200 µl para la solución nVS y 2x100 µl para VS (4).

En el caso de los embriones, se utiliza un volumen de 100 µl para la solución nVS, donde el tiempo de exposición dura 4 minutos. Posteriormente, al igual que para los ovocitos, los blastocistos se expondrán a dos gotas de VS, de 100 µl cada una, durante un minuto (4).



**Figura 1. Representación esquemática de las diferencias de los procesos de vitrificación C-VIT y UF-VIT en ovocitos.** Las flechas azules indican el flujo de H<sub>2</sub>O, mientras que las flechas rojas señalan el movimiento de los ACPs (7).

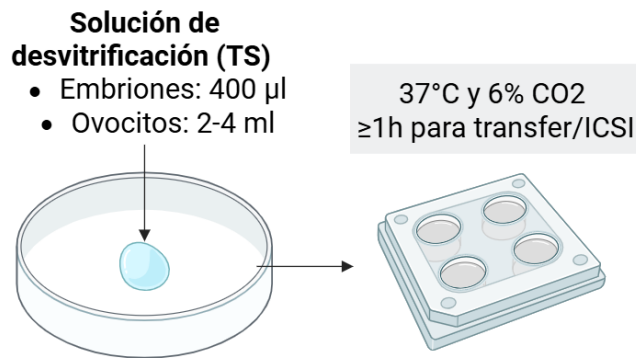
### 1.3.2 ¿QUÉ ES LA DESVITRIFICACIÓN ULTRARRÁPIDA (RE)?

A pesar de que los protocolos convencionales de desvitrificación se basan en procedimientos secuenciales que emplean soluciones osmóticas graduales, con el fin de evitar la entrada brusca de agua al embrión, estudios recientes han indicado que la omisión de este proceso escalonado no afecta negativamente ni a la supervivencia embrionaria, ni a los resultados posteriores a la transferencia. No obstante, la mayoría de los informes publicados hasta ahora se han centrado principalmente en las tasas de embarazo, por lo que se requiere un análisis más exhaustivo sobre los efectos de los cambios osmóticos rápidos en los embriones, con el objetivo de avanzar hacia la estandarización del protocolo.

La desvitrificación ultrarrápida (RE, del inglés, *Rapid Elution*) representa una alternativa simplificada frente al protocolo convencional. Este enfoque consiste en sumergir directamente la muestra en la solución de desvitrificación (TS, del inglés, *Thawing Solution*) a 37 °C durante 1 minuto, utilizando un volumen de 2 - 4 ml para los ovocitos y de 400 µl para los embriones. Posteriormente, los ovocitos y embriones se deben mantener en placas de cultivo en condiciones controladas (37 °C y 6% de CO<sub>2</sub>) al menos una hora antes de la realización de ICSI o transferencia, respectivamente (4,12,14).

A diferencia del protocolo estándar, que incluye múltiples etapas secuenciales con soluciones de concentración decreciente (TS, DS, WS1, WS2) y tiempos de exposición más prolongados (hasta 12 minutos en total), la desvitrificación ultrarrápida reduce significativamente la duración del proceso y minimiza la manipulación de las células. Cabe resaltar que, aunque el kit (tanto de UF-VIT como de RE) ya haya obtenido la conformidad con la Unión Europea y haya sido comercializado, este protocolo aún no ha sido instaurado en la mayoría de los centros de reproducción asistida. Esta estrategia busca disminuir el estrés osmótico y térmico, sin comprometer la supervivencia celular ni los resultados clínicos (14,15).

Placa 90mm | 37 °C | Tiempo total = 1 min



**Figura 2. Representación del proceso de desvitrificación ultrarrápida (RE) en ovocitos y embriones. Creado en BioRender.**

## 2. OBJETIVOS.

La vitrificación de ovocitos y embriones se considera actualmente una técnica estandarizada en la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida. No obstante, numerosos estudios han evidenciado que esta técnica puede inducir daño celular debido al estrés térmico y osmótico al que se ven sometidas las muestras durante el proceso de criopreservación.(13) En este contexto, la vitrificación y desvitrificación ultrarrápida surgen como una alternativa innovadora que podría minimizar dichos efectos adversos, al reducir la exposición a ACPs y acortar los tiempos críticos del procedimiento.

Por ello, este trabajo tiene como objetivo principal estudiar la viabilidad y aplicabilidad clínica tanto de la vitrificación como desvitrificación ultrarrápida en ovocitos y embriones, analizando su capacidad para reducir la toxicidad de los ACPs y el estrés osmótico, así como su impacto en la supervivencia ovocitaria y el desarrollo embrionario hasta estadio de blastocisto.

Los objetivos secundarios se centran en:

- Comparar la toxicidad de los ACPs empleados en vitrificación convencional frente a la UF-VIT, evaluando su impacto sobre la viabilidad ovocitaria.

- Determinar si tiempos de exposición reducidos ( $\leq 2$  minutos) a ACPs estándar permiten una permeabilización eficaz sin comprometer la supervivencia post-desvitrificación.
- Validar un modelo experimental basado en vesículas germinales para la estandarización de protocolos de vitrificación ultrarrápida.
- Analizar el grado de estrés osmótico inducido por UF-VIT y su relación con alteraciones morfológicas y funcionales en los ovocitos tras la desvitrificación.

### 3. MÉTODOS.

Para la estructuración del diseño metodológico, se empleó la estrategia PICO (Población, Intervención, Comparación y Resultado), con el fin de delimitar claramente los parámetros de análisis. En este contexto, la población de estudio corresponde a ovocitos y embriones humanos, mientras que la intervención consiste en la aplicación de técnicas de vitrificación y desvitrificación ultrarrápida. Como grupo control, se consideraron los procedimientos realizados mediante protocolos de vitrificación y desvitrificación convencional. Por otro lado, los resultados de los estudios seleccionados fueron evaluados en función de tres criterios principales: la tasa de supervivencia post-desvitrificación, la calidad morfológica de ovocitos y embriones y su capacidad de desarrollo hasta blastocisto.

La elaboración de este trabajo se basó en una búsqueda bibliográfica del tema de interés durante el periodo comprendido entre el 1 de abril y el 1 de julio de 2025. Para ello, se utilizaron las bases de datos de PubMed, Web of Science (WoS) y Scopus.

En una primera fase, se seleccionaron los términos de búsqueda y sus posibles combinaciones. Para optimizar la precisión en PubMed, se utilizó la herramienta DeCS (Descriptores en Ciencias de la Salud) con el fin de identificar los términos equivalentes en el tesoro MeSH (Medical Subject Headings) para cada concepto clave. Esto permitió estandarizar los descriptores en inglés y garantizar una recuperación documental más específica.

El idioma principal de búsqueda fue el inglés, dada la predominancia de publicaciones relevantes en dicho idioma. Además, se aplicaron operadores booleanos como AND, OR y NOT para afinar las estrategias de búsqueda. En cuanto a los criterios temporales,

se priorizó la selección de artículos publicados a partir del año 2010, con el fin de incluir la evidencia más actualizada y pertinente al desarrollo tanto de la vitrificación, como de la desvitrificación ultrarrápida.

## **4. RESULTADOS.**

### **4.1 UF-VIT EN OVOCITOS.**

#### **4.1.1 VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO DE UF-VIT EN OVOCITOS EN FASE DE VESÍCULA GERMINAL (VG).**

Dado que la creación de embriones viables utilizando espermatozoides está estrictamente prohibida para fines de investigación, se recurrió a la activación ovocitaria artificial (AOA) para desencadenar el desarrollo embrionario partenogénico. Se utilizaron ovocitos en fase de VG como modelo experimental con el objetivo de evaluar la eficacia del protocolo de UF-VIT. Para ello, se realizó un estudio piloto prospectivo de cohortes donde el objetivo era evaluar si los ovocitos en fase de VG pueden servir como un modelo eficaz para probar la eficacia de los tratamientos de vitrificación UF-VIT y RE, con el fin de lograr altas tasas de supervivencia y mantener la funcionalidad a largo plazo.

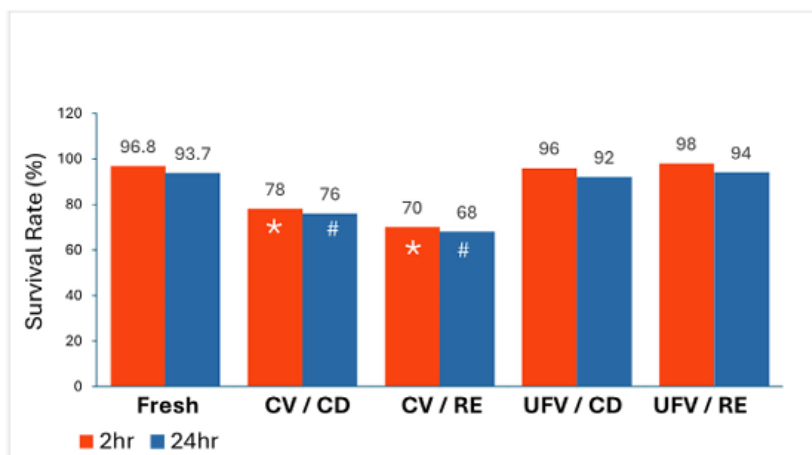
Para llevar a cabo el estudio, se comparó el método actual de vitrificación (ES-12min, VS-1 min; n=50) con el método de UF-VIT (ES-1 min, VS-1 min; n=50) tras la maduración in vitro (IVM) bajo condiciones controladas a 37°C y cámara trigas. A las 24 y 48 horas, se evaluó el estado de maduración clasificando su estado como degenerados, VG, metafase I (MI) o metafase II (MII). Además, los ovocitos de ambos grupos fueron asignados para llevar a cabo una desvitrificación convencional (CD) (TS-1 min, DS-3 min, WS-5 min y 1min) o una RE (TS-1 min y MHM-CorLG-Hepes-5min). Como control se utilizaron ovocitos frescos de donante.

Se evaluó la supervivencia celular, la competencia de desarrollo, la maduración nuclear, la integridad del huso meiótico y la capacidad de división celular.

Respecto a la supervivencia celular, destacar que la supervivencia de los ovocitos UF-VIT (96-98%) fue similar a la de los controles frescos, los cuales experimentaron una degeneración de un 3.2% in vitro. La supervivencia de los ovocitos bajo C-VIT, tanto



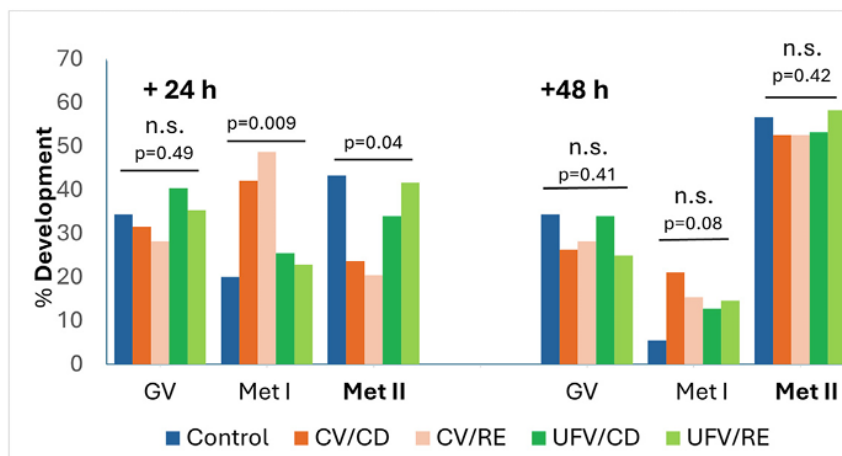
de C-VIT/CD como de C-VIT/RE fue destacablemente menor ( $p = 0.03$ ; 78 y 70%, respectivamente). En todos los grupos se perdió de un 2 a un 4% en viabilidad celular en el paso de las 2 a las 24 horas (11) (Figura 3).



**Figura 3. Tasas de supervivencia (%) de VG después de la criopreservación evaluadas a las +2 horas y +24 horas tras la desvitrificación (n=50 por tratamiento de vitrificación, n=89 en controles frescos).** Los símbolos indican una diferencia significativa en las tasas de supervivencia (prueba de Chi-cuadrado por pares) en comparación con cada grupo fresco, UF-VIT/CD y UF-VIT/RE a las 24 horas (\*,  $p=0.001-0.007$ ) y a las 48 horas (#,  $p=0.001-0.03$ ).

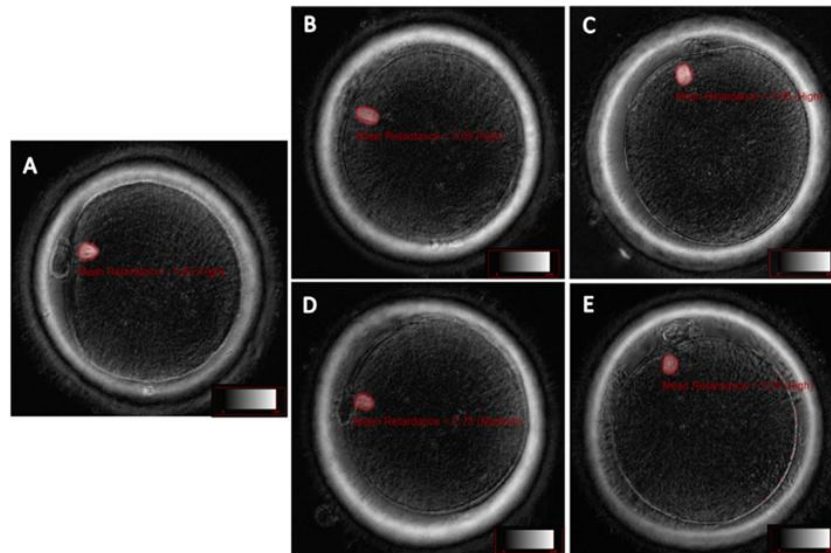
CV-vitrificación convencional, UFV-vitrificación ultrarrápida, CD-desvitrificación convencional, RE-desvitrificación ultrarrápida.

Por otro lado, el grupo UF-VIT/RE mostró una tasa de maduración similar MII a las +18-24h, en comparación con el grupo fresco control (41.7% y 43.3%%, respectivamente), siendo superior ambos tratamientos ( $p<0.05$ ) que la C-VIT (20.5-23.7%). A su vez, los tratamientos CV/CD y CV/RE mostraron una mayor transición a MI a las +24 horas (42.1% y 48.7%, respectivamente) en comparación con un 20–25.5% de MI en los otros grupos. A las +48 horas de cultivo in vitro, no se detectaron diferencias en la maduración, con un rango que va desde un 58.3% de MII en el tratamiento UF-VIT/RE hasta un 52.6% en los grupos CV (11) (Figura 4).



**Figura 4. % de IVM de VG después de la criopreservación evaluadas a las +24 y +48h tras la desvitrificación.** Se utilizaron pruebas de Chi-cuadrado para comparar entre todos los grupos.

La integridad del huso meiótico fue evaluada mediante microscopía de luz polarizada (Polscope), que permite observar la organización del huso y medir la retardancia (indicador de la densidad de microtúbulos). A las 24 y 48 horas post-desvitrificación, la proporción de husos intactos fue alta y no mostró diferencias significativas entre los grupos de tratamiento (80–100% a las 24 h; 86.7–100% a las 48 h). Sin embargo, sí se observaron diferencias en la retardancia media del huso a las 48 horas. El grupo tratado con C-VIT presentó una retardancia significativamente menor (2.23 nm) en comparación con los controles frescos (3.13 nm;  $p = 0.01$ ), lo que podría indicar una menor densidad de microtúbulos. Por otra parte, el grupo tratado con UF-VIT mostró una retardancia intermedia (2.90 nm), más cercana a los valores observados en ovocitos frescos, lo que sugiere una mejor preservación de la estructura del huso (Figura 5).



**Figura 5. Detección mediante microscopía de luz polarizada (PLM) de la retardancia del huso meiótico en ovocitos en fase de VG que maduraron in vitro hasta la fase MII durante 24 horas.** Se muestra una imagen representativa del retardo medio de un solo ovocito de cada grupo y su clasificación objetiva asignada por el software Oosight Meta™ (Bajo <2.0 nm, Medio <3.0 nm, Alto >3.0 nm): A) Control fresco; B) UF-VIT y RE; C) UF-VIT y CD; D) CV y CD; y E) CV y RE.

Estos resultados sugieren que el protocolo de UF-VIT, combinado con RE (UF-VIT/RE), preserva eficazmente la integridad del huso meiótico, manteniéndola en condiciones similares a las de ovocitos frescos. En contraste, la vitrificación convencional, seguida de elución rápida (CV/RE), puede comprometer ligeramente la densidad del huso, aunque sin alterar su integridad estructural ni orientación (11).

#### **4.1.2 DESARROLLO DE EMBRIONES A PARTIR DE OVOCITOS TRATADOS CON UF-VIT.**

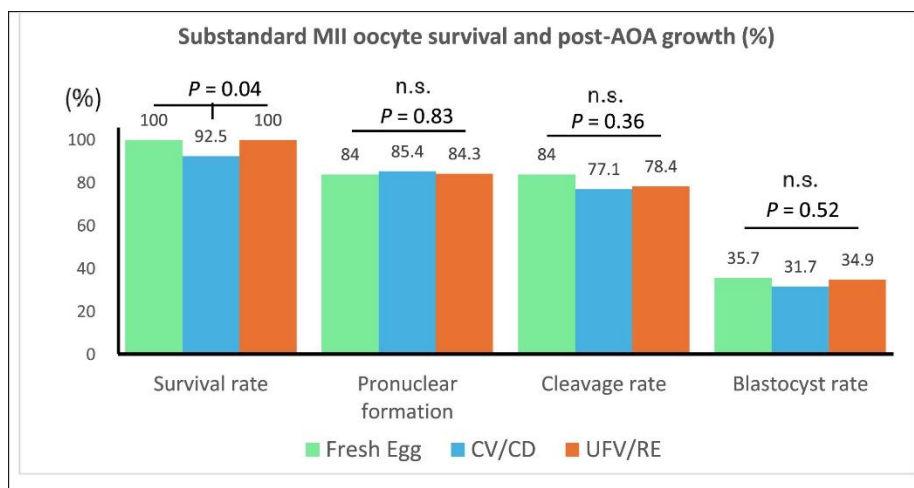
Como se demostró previamente en los estudios iniciales del modelo de VG, que introducen una nueva alternativa a la C-VIT, la UF-VIT con RE puede lograr altas tasas de supervivencia de forma rutinaria (11). Las elevadas tasas de supervivencia obtenidas con UF-VIT se atribuyen principalmente a la mínima carga de ACPs tras el proceso de deshidratación. Al reducir el tiempo y la cantidad de exposición a los mismos, se minimizan los efectos tóxicos de compuestos como el DMSO sobre la integridad de la

membrana celular, evitando alteraciones en la permeabilidad y el transporte de solutos a través de la misma (13).

El siguiente paso para lograr su incorporación a la clínica sería demostrar que el desarrollo de embriones a partir de ovocitos tratados con UF-VIT es igual o superior al de los ovocitos bajo C-VIT. Para ello, se comparó el tratamiento C-VIT con la técnica UF-VIT en ovocitos maduros derivados de VG. Se compararon los dos tratamientos de vitrificación utilizando un protocolo óptimo de AOA tanto en Hanabusa IVF (n=16) como en Santa Monica Fertility (n = 137), añadiéndose un grupo control en fresco (12).

Con respecto al análisis de los ovocitos madurados in vitro a partir de metafase I, se registró la formación de pronúcleos, la tasa de división embrionaria y la tasa de producción de blastocisto.

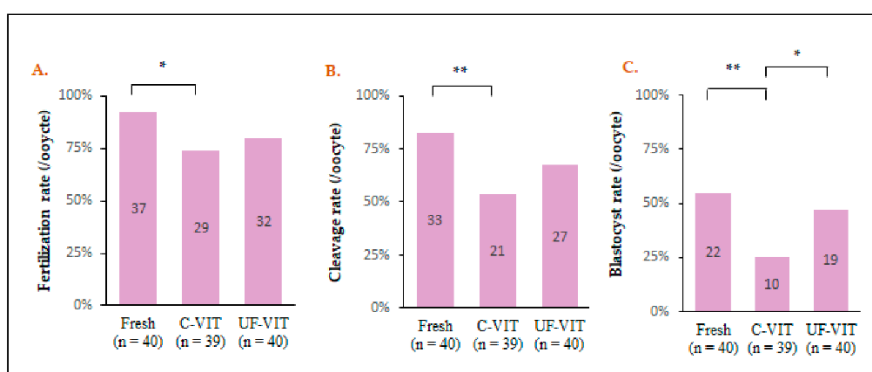
Es resaltable el hecho de que el 100% del grupo UF-VIT/RE sobrevivió tras la descongelación, en comparación con el 92.5% de supervivencia del grupo C-VIT/CD ( $p=0.04$ ). Por otra parte, tras la AOA, el grupo UF-VIT/RE respondió tan satisfactoriamente en lo que respecta a la formación de pronúcleos, como el grupo control y C-VIT/CD (con unos valores de 84.3, 84 y 85.4, respectivamente), siendo ligeramente mayor la formación pronuclear en el grupo C-VIT/CD, pero no estadísticamente significativo ( $p=0.83$ ). Por último, añadir que tanto en la tasa de segmentación como en la de blastocisto el grupo UF-VIT/RE obtiene porcentajes ligeramente superiores al grupo C-VIT/CD. Pese a que las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.36$  y  $p=0.52$ , respectivamente), sí que muestran una tendencia favorable a la UF-VIT/RE, especialmente en la tasa de blastocistos (12) (Figura 6).



**Figura 6. Desarrollo de ovocitos M-II tras AOA para el grupo control con ovocitos en fresco, CV/CD y UF-VIT/RE.** Se evaluó la tasa de supervivencia, la formación de pronúcleos, la tasa de segmentación y la tasa de blastocisto en los días 5 y 6.

La tasa de blastocistos se calculó por cigoto pronuclear (control = 15/42; CV/CD = 13/41; UFV/RE = 15/43). Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para determinar las diferencias entre tratamientos de vitrificación.

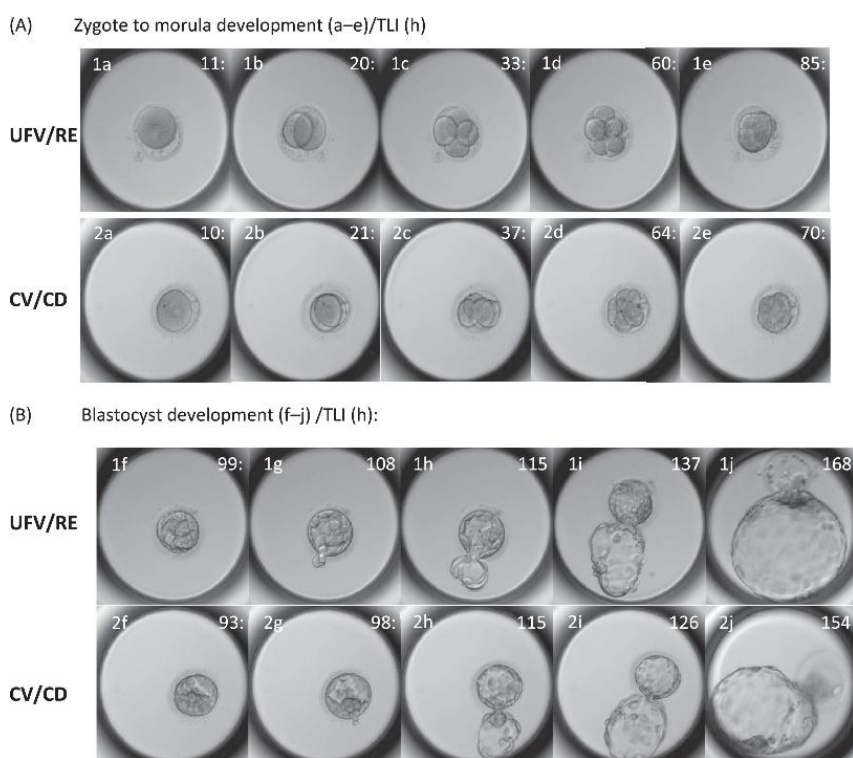
Además, los mismos resultados se vieron respaldados en otras publicaciones, donde, al comparar directamente ambos métodos, se observó una diferencia significativa en la tasa de formación de blastocisto, favoreciendo a la UF-VIT (25.6% de C-VIT frente a 47,5% de UF-VIT,  $p < 0.05$ ) (Figura 7) (7).



**Figura 7. Comparación del desarrollo embrionario tras V/W con C-VIT y UF-VIT.** (A–C) Los gráficos de barras representan las tasas de fertilización, segmentación y formación de blastocistos de los ovocitos después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

El objetivo principal fue demostrar que los ovocitos desvitrificados por UF-VIT podían ser activados para iniciar un desarrollo embrionario normal y alcanzar el estadio de blastocisto con la misma eficacia que los métodos convencionales o los ovocitos en fresco. Los grupos evaluados fueron: control en fresco (n=50), UF-VIT/RE (n=51) y C-VIT/CD (n=52). Se consideró como resultado óptimo que la tasa de blastocistos obtenida con UF-VIT fuese igual o superior a la observada en la vitrificación convencional, y preferiblemente similar a la del grupo control en fresco. El cumplimiento de este criterio respaldaría la viabilidad de la UF-VIT y serviría como base para su evaluación en ensayos clínicos controlados (12).

La normalidad y calidad del desarrollo embrionario se registraron con la tecnología *time-lapse*, mostrando una correcta evolución para ambos grupos (Figura 8).



**Figura 8. Imágenes time-lapse (TLI) obtenidas con GERI que muestran las etapas de desarrollo de ovocitos activados artificialmente tras aplicar los protocolos de interés de vitrificación.** (A) Evaluación time-lapse del desarrollo de ovocitos en metafase II después de la AOA en dos grupos: (1) UF-VIT/RE y (2) CV/CD. Se observaron las siguientes etapas del desarrollo embrionario:

(a) Formación de pronúcleos, (b) estadio de dos células, (c) cuatro células) y (e) mórula.

(B) Etapas del desarrollo de blastocisto: (f) mórula cavitando, (g) blastocisto temprano, (h) blastocisto comenzando a eclosionar, (i) blastocisto en eclosión y (j) blastocisto

eclosionado. El tiempo mostrado corresponde a horas después del tratamiento con AOA ( $t = 0$  h).

Los resultados mostraron que la tasa de producción de blastocistos obtenida con UF-VIT fue comparable a la de la CV y a la de los ovocitos frescos, cumpliendo el criterio establecido para considerar su viabilidad clínica y respaldando su potencial aplicación en ensayos clínicos futuros (12).

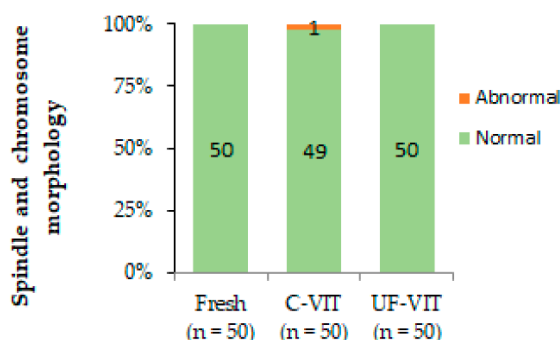
#### **4.1.3 EFECTOS DE LA UF-VIT EN LOS ORGÁNULOS OVOCITARIOS.**

La integridad de los orgánulos ovocitarios, como el huso meiótico, las mitocondrias (MT) y el retículo endoplásmico, es crucial para una correcta fecundación y desarrollo embrionario. La toxicidad de altas concentraciones de ACPs puede alterar al RE, el componente fundamental del sistema de liberación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Este daño provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE, lo que incrementa su concentración a nivel intracelular en las MT, reduciendo su potencial de membrana ( $\Delta\Psi\text{m}$ ). Estos cambios comprometen la viabilidad y competencia del ovocito (7). En este contexto, la UF-VIT busca minimizar estos efectos al reducir el tiempo y la carga de ACPs, como evaluó este estudio en la preservación de los orgánulos clave, proporcionando información relevante para su implementación clínica a través de un estudio en ovocitos MII de ratón. Los orgánulos, incluyendo el huso y las mitocondrias, se recuperan entre 120 y 180 minutos después de la descongelación. Es por ello por lo que el cultivo se completó 150 minutos después de la descongelación (7).

Respecto a la distribución de MT, se estudió su distribución e intensidad de fluorescencia, lo que fue clasificado como una distribución uniforme en todo el ovocito (normal) o agregada en áreas dañadas (anormal). El análisis de la distribución mitocondrial mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control (43/50; 86%), C-VIT (7/50; 14%;  $p < 0.001$ ) y UF-VIT (23/50; 46%;  $p < 0.001$ ). Además, los ovocitos tratados con C-VIT presentaron una agregación mitocondrial significativamente mayor que aquellos tratados con UF-VIT ( $p < 0.01$ ). Por otro lado, aunque no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la intensidad de fluorescencia de MT de los ovocitos tratados con UF-VIT ( $173 \pm 22,29$  gray,  $p=1.000$ ) y el control, los ovocitos tratados con C-VIT

presentaron efectos adversos en comparación con los ovocitos tratados con UF-VIT ( $p < 0.001$ ).

En relación con el huso meiótico y la morfología cromosómica de los ovocitos, los resultados mostraron que los ovocitos UF-VIT lograron una recuperación completa (100%,  $p=1.000$ ), al igual que los grupos C-VIT (98%,  $p=1.000$ ) y control (100%) (7) (Figura 9).



**Figura 9. Análisis de la morfología del huso meiótico y los cromosomas en el grupo control, C-VIT y UF-VIT.**

## 4.2 UF-VIT EN EMBRIONES.

Dado que, aunque la vitrificación embrionaria se lleve realizando casi dos décadas, aún no hay consenso claro sobre el correcto tiempo de exposición de los embriones a los tiempos de vitrificación y desvitrificación (4). Es por ello por lo que surge la necesidad de analizar la reducción de los tiempos de vitrificación y desvitrificación en la tasa de supervivencia de los blastocistos y posterior tasa de embarazo.

En otro estudio se llevó a cabo un análisis retrospectivo de 754 transferencias de embriones congelados (FET) entre enero de 2022 y marzo de 2023, donde los embriones se dividieron en 3 grupos: (1) C-VIT y CD, (2) C-VIT y RE. y (3) UF-VIT y RE. La supervivencia de blastocisto fue del 99.44, 98.1% y 100%, respectivamente, y las tasas de embarazo del 65.6%, 71.7% y 74.6%, respectivamente. Los resultados, aunque no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, mostraron que el protocolo UF-VIT/RE obtuvo las mayores tasas de supervivencia del blastocisto y de embarazo (consideradas con  $\beta$ -HCG positiva). Estos datos se



traducirían en que la reducción del tiempo de exposición en n-VS no tuvo un efecto negativo en la supervivencia del blastocisto ni en las tasas de embarazo (16).

Otros resultados respaldan que la supervivencia de los blastocistos no se ve afectada por la reducción a la dilución en un solo paso y que todos los embriones mostraron respuesta osmótica con membranas celulares intactas (17).

Por tanto, la evidencia de la disminución del tiempo de equilibrado cada vez se ve más respaldada por diversos estudios. Un estudio retrospectivo analizó los efectos del tiempo de equilibrado en diversos parámetros en 763 blastocistos de mujeres jóvenes (<35 años). Se dividieron en dos grupos: 6-7 min (n=361) y 9-10 min (n=402). Las tasas de supervivencia, implicaciones clínicas y neonatales fueron similares en ambos grupos, lo que sugeriría que 6-7 min de equilibrado son suficientes, sin sumar ningún beneficio la exposición durante 9-10 min (4).

#### **4.3 APLICACIÓN DE LA RE EN OVOCITOS Y EMBRIONES HUMANOS.**

##### **4.3.1 RE EN OVOCITOS.**

En diversos estudios, la UF-VIT en ovocitos se ha combinado también con la RE, obteniendo resultados muy satisfactorios. Así fue por ejemplo en una cohorte de VG y MI, donde se obtuvieron tasas de supervivencia mayores del 90% con la combinación de ambos protocolos: UF-VIT con 1 min de equilibrado + 1 minuto de solución vitrificación y RE con una concentración baja en disacáridos (0.5M en lugar de 1M) (10,14). De manera similar, otros resultados, ya comentados anteriormente, demostraron que la combinación UF-VIT y RE resultó ser la más efectiva a nivel de la supervivencia ovocitaria. También demostraron que la integridad genética de los ovocitos tratados con estos protocolos se mantenía por completo y debería dar un desarrollo normal del embrión (4,11). En un artículo recién presentado en el congreso de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), se comparó la CD (grupo A, n=634) con la RE (grupo B, n=531) utilizando ovocitos MII. Se valoró la supervivencia (1 hora post-descongelación), degeneración post-ICSI, fertilización, desarrollo de blastocisto y morfocinética vía time-lapse hasta el día 5. Los resultados revelaron que la supervivencia fue mayor en el grupo B (98%), en comparación con el grupo A (89%) ( $p=0.03$ ); la degeneración post-ICSI fue menor en el grupo RE en comparación con el grupo CD (0.8% vs. 8.9%,  $p < 0.01$ ); y se obtuvo mayor número

de blastocistos en día 5 de alta calidad (4-6AA/AB) en el grupo B (58%), en comparación con el grupo A (45%) ( $p=0.04$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de fertilización, división, euploidía o tasas de RNV ( $p>0.05$ ). Por último, las tasas de embarazo clínico por transferencia de un único embrión fueron del 65.2% en el grupo B y del 54.3% en el grupo A. Todos estos resultados apuntan a que la RE puede optimizar los parámetros morfocinéticos, lo que potencialmente mejoraría la selección embrionaria y los resultados de la FIV (18).

#### 4.3.2 RE EN EMBRIONES.

Con el objetivo de comprobar si los embriones desvitrificados con RE mostraban tasas de embarazo similares al protocolo estándar CD, en múltiples pasos, se realizó un estudio de cohortes retrospectivo de 3439 FET (14). Se compararon los resultados clínicos de 833 FET realizados mediante el protocolo de RE con un grupo control compuesto por 2606 FET descongelados bajo CD. El resultado principal analizado fue la tasa de embarazo en curso, mientras que los resultados secundarios incluyeron las tasas de supervivencia, embarazo positivo, embarazo clínico, implantación y aborto espontáneo.

Respecto al resultado principal, se observó una diferencia significativa ( $p=0.011$ ) en la tasa de embarazo en curso entre el grupo RE y CD. La tasa de embarazo en curso fue del 60.4% (503/833) en el grupo RE, en comparación con un 55.4% (1443/2606) del grupo control CD. Por otra parte, se realizó un modelo de regresión logística multivariada en el que se observó que la mejora de la RE en la tasa de embarazo en curso es independiente de la edad, de la realización del test genético preimplantacional (PGT), el día de desarrollo del blastocisto en el momento de la transferencia y del grado del embrión. Los resultados mostraron que la RE incrementó la tasa de embarazo en curso un 26% (95% CI 1.076-1.484).

Referente a los resultados secundarios, el protocolo de un solo paso mostró una mejora porcentual en todos los parámetros, con un aumento significativo en las tasas de implantación, así como una reducción en la tasa de abortos. Las tasas de supervivencia fueron idénticas en ambos grupos (99.5%). La tasa de implantación, superior en el grupo RE, fue del 63.6% (560/833), en comparación con el grupo CD (57%, 1646/2606) con una  $p=0.0005$ . Además, como ya mencionado, la tasa de aborto del 4% en el

protocolo RE fue significativamente menor, en comparación con el 7.6% en el grupo CD ( $p=0.0001$ ) (14).

Otros resultados sugirieron que no había diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia inicial y la reexpansión (24 horas más tarde), entre los embriones descongelados bajo RE y CD. Un total de 71 blastocistos se distribuyeron en dos grupos: RE ( $n=39$ ) y CD ( $n=32$ ). Tras 24 horas en cultivo, el 100% de los blastocistos RE se reexpandieron, mientras que 31/32 de los embriones CD se reexpandieron (96.9%,  $p = NS$ ) (19).

## 5. ARGUMENTACIÓN CRÍTICA.

La vitrificación se ha consolidado como el método de criopreservación de referencia en los centros de reproducción asistida y los esfuerzos actuales se centran en optimizar aún más su eficiencia. Es por ello por lo que la reducción de los tiempos de equilibrado y rehidratación resulta interesante por diversas razones. En primer lugar, simplificaría los procedimientos, favoreciendo una mayor estandarización y reproducibilidad de los mismos. En segundo lugar, disminuiría el tiempo de exposición a las condiciones subóptimas de temperatura y osmolaridad para las células. Finalmente, acortar dichos tiempos contribuiría a mitigar posibles efectos genéticos, epigenéticos y tóxicos derivados de la exposición prolongada a los ACPs (4). La interpretación de estas evidencias se basa en los siguientes puntos.

Este estudio fue sin duda uno de los pioneros en demostrar que reducir el tiempo de exposición a temperaturas y osmolaridades subóptimas, así como a crioprotectores potencialmente tóxicos, era factible: lograron una vitrificación celular metaestable aplicando una exposición mínima de 2 pasos en intervalos de 1 minuto, basándose en una congelación en un estado deshidratado, que minimiza la exposición potencialmente tóxica a ACPs de una manera eficiente en el tiempo (11). La vitrificación metaestable hace referencia a un estado vítreo en el que el agua intracelular permanece sin formar cristales, aunque sigue existiendo un riesgo de recristalización durante el proceso si no se realiza de forma adecuada. Gracias a estos resultados, se obtuvo un nuevo camino a seguir para optimizar la supervivencia y funcionalidad de los orgánulos tras la criopreservación. Sin embargo, a pesar del éxito en términos de viabilidad inmediata,

los autores reconocen que el criterio de éxito de este enfoque ultrarrápido es preliminar, debido a que faltarían estudios detallados sobre la competencia de desarrollo posterior (como la tasa de segmentación o implantación), esenciales para confirmar su aplicabilidad a largo plazo. En conjunto, este estudio sugiere que protocolos abreviados de deshidratación podrían mejorar la funcionalidad del proceso de vitrificación, aunque se requerirán validaciones adicionales para su implementación clínica (13).

Para continuar con la línea de investigación anterior e intentar dar respuestas que aportaran más veracidad a los resultados, se cuestionó si podrían las VG servir como un modelo eficaz para probar la eficacia de UF-VIT/RE. En general, el modelo VG resultó ser un recurso útil para corroborar el prometedor potencial de la tecnología UF-VIT y lograr de una forma fiable una alta supervivencia y un desarrollo normal con mayor eficiencia en el tiempo (11). En primer lugar, el hecho de que la supervivencia celular tras UF-VIT fuera comparable a la de los controles en fresco resalta la hipótesis de que la menor exposición a ACPs en UF-VIT reduce el estrés osmótico y la toxicidad asociada, minimizando el daño estructural (13). En cuanto a la maduración nuclear, se observó un patrón diferenciado, donde los ovocitos tratados con UF-VIT/RE alcanzaron tasas de transición a MII similares a las de los controles frescos y superando de manera significativa al grupo C-VIT. Este hallazgo sugiere que la UF-VIT, además de garantizar una alta supervivencia inmediata, conserva la competencia de desarrollo, lo que refuerza su importancia para una futura aplicación clínica. Por último, respecto a la integridad del huso meiótico, el hecho de que haya una reducción destacable en la densidad de microtúbulos de los ovocitos tratados con C-VIT refuerza la necesidad de encontrar una técnica que preserve con mayor eficacia estos orgánulos tan relevantes para la célula. Esta disminución podría afectar a la arquitectura del huso meiótico, lo que tendría repercusiones en la correcta segregación cromosómica. Por el contrario, los ovocitos tratados con UF-VIT mostraron unos valores más cercanos a los del grupo control, lo que ofrecería una mejor preservación funcional del huso meiótico.

De manera global, estos resultados sugieren que la UF-VIT, especialmente combinada con protocolos de RE, podría convertirse en una estrategia más ventajosa para la preservación ovocitaria. De todas formas, es importante destacar que los resultados provienen de modelos experimentales basados en ovocitos inmaduros en fase de VG, por lo que sería interesante validar estos hallazgos en ensayos clínicos directamente con

ovocitos MII y obtener resultados clínicos como la tasa de fecundación, blastocisto y embarazo en curso (11).

Es por ello por lo que el siguiente paso, el estudio del desarrollo de embriones a partir de ovocitos tratados con UF-VIT, es fundamental para lograr su traslacionalidad clínica. La evidencia obtenida refuerza la idea de que la UF-VIT podría ser una alternativa sólida a la C-VIT, sobre todo hablando en términos de supervivencia y potencial de desarrollo embrionario. Aunque las diferencias en la formación de pronúcleos, segmentación y desarrollo a blastocisto no alcanzaron la significación estadística, muestran una tendencia a favor de la UF-VIT. Sí que resultaron realmente llamativas las tasas de supervivencia post-desvitrificación, donde las de la técnica UF-VIT/RE fueron del 100%, al igual que las del control fresco. En contraste, las tasas de supervivencia de C-VIT/CD resultaron ser considerablemente menores (92.5%). Este hecho es realmente interesante, pues el verdadero valor añadido de la UF-VIT radica en su capacidad para igualar la calidad embrionaria resultante con ovocitos frescos. La UF-VIT es un método más eficiente en el tiempo, con mayores tasas de supervivencia y, por lo tanto, con mayor potencial de generar más embriones, lo que justificaría la continuación de aplicaciones estratégicas en ensayos clínicos (12). Además, el hecho de que estos resultados se vean reforzados por las conclusiones de otros estudios, donde se han obtenido diferencias estadísticamente significativas en la tasa de blastocisto, con mayor porcentaje en la UF-VIT, en comparación con C-VIT (47.5% frente a 25.6%), consolida la hipótesis inicial del estudio: la reducción del tiempo de exposición a ACPs favorece tanto la supervivencia celular como la competencia de desarrollo embrionario (7). A la espera de resultados de RNV derivados de UF-VIT, los autores sostienen, basándose en sus propios resultados y los avances recientes de otros grupos, que la UF-VIT representa una alternativa sólida que puede resolver numerosas limitaciones de la vitrificación ovocitaria convencional (7,10,11).

Si un aspecto resulta evidente tras este análisis, es que, uno de los objetivos principales de la UF-VIT es reducir la toxicidad celular derivada de los ACPs. La función de las MT juega un papel crucial en el suministro de ATP y el desarrollo embrionario, así que la función reducida de las mismas debido a la toxicidad de ACPs conduce a un agotamiento de energía, lo que podría resultar en un menor desarrollo del blastocisto. Así lo confirman los resultados expuestos, teniendo en cuenta que el grupo C-VIT mostró resultados negativos en la tasa de supervivencia y en todos los parámetros

relacionados con RE y MT, mientras que el grupo UF-VIT tuvo menos efectos negativos en estos valores y consiguió una tasa de formación de blastocistos superior (7). Además, durante la vitrificación, los cambios bruscos en el volumen celular pueden desencadenar un shock osmótico, afectando a la organización y distribución de los orgánulos ovocitarios. Para minimizar este riesgo, es imprescindible reducir al máximo las variaciones en el volumen celular causadas por el estrés osmótico. En el protocolo C-VIT, durante la fase de exposición a la solución de equilibrado, las moléculas de agua salen de la célula por efecto de la presión osmótica, provocando una contracción inicial hasta alcanzar un volumen mínimo. Es decir, la célula se encoge. Posteriormente, entra de forma progresiva ACP y agua, restableciendo un equilibrio osmótico parcial, antes de que en el paso de exposición a la solución de vitrificación se produzca una nueva salida de agua, que conduce finalmente a la vitrificación (tiene lugar un proceso de contracción - expansión- contracción). Sin embargo, en la UF-VIT, solo hay un único ciclo de contracción, pues al alcanzar el volumen mínimo se procede directamente a la vitrificación, evitando que la célula se reexpanda. Gracias a esta dinámica abreviada y a la reducción de cambios en el volumen celular, los ovocitos sometidos a UF-VIT presentaron una distribución del retículo endoplásmico semejante a la de los ovocitos frescos, sin mostrar efectos adversos en su desarrollo posterior, en contraste con lo ocurrido en el grupo C-VIT. Sin embargo, teniendo en cuenta que este estudio se realizó en ovocitos de ratón, sería necesario realizar estudios clínicos adicionales en ovocitos humanos para mejorar la intensidad del retículo endoplásmico y la distribución de las mitocondrias en UF-VIT (7).

Actualmente, las FET representan más del 35% de todos los procedimientos de TRA en países europeos y en todo el mundo. Teniendo en cuenta estos datos, surge la oportunidad de considerar que aún es posible optimizar aún más la vitrificación embrionaria, simplificando y acortando los protocolos de manera satisfactoria. Se ha demostrado que los medios de vitrificación ultrarrápidos, combinados con un protocolo de RE, alcanzaron las cifras más elevadas tanto de supervivencia, como de embarazo, aunque sin diferencias estadísticamente significativas frente a los protocolos convencionales (16). Este hallazgo resulta relevante porque, una vez más, respalda el hecho de que una menor exposición a los ACPs y una menor manipulación de los embriones podría disminuir potencialmente el daño celular acumulativo, sin conllevar implicaciones clínicas negativas. Además, son diversos los estudios que ya demuestran

que una prolongación innecesaria de los tiempos de equilibrado no aporta beneficios adicionales a los blastocistos expandidos, sino todo lo contrario (4). La implementación de este protocolo tendría un gran interés para la dinámica del laboratorio, ya que permitiría reducir significativamente los tiempos de manipulación, optimizando los flujos de trabajo y aumentando la eficiencia en los procesos rutinarios.

Una vez demostrada la eficacia de la UF-VIT en la preservación de la viabilidad y la competencia de desarrollo de los ovocitos, resulta imprescindible analizar su aplicación combinada con la RE, dado que ambas técnicas comparten el mismo fin: reducir el tiempo de exposición a ACPs y mejorar la dinámica del laboratorio, optimizando considerablemente el tiempo de los protocolos (14). Este procedimiento mejoraría notablemente las rutinas diarias del laboratorio, pues reduce 10 veces el tiempo de procesamiento, contribuyendo a mejorar la eficacia general de los tratamientos FIV. La incorporación de este protocolo a la práctica clínica rutinaria podría aumentar la eficiencia y el éxito de los ciclos de criopreservación de ovocitos. Además, esta técnica elimina el riesgo asociado a la micromanipulación durante los procesos de desvitricación (20).

En el caso de los ovocitos, diferentes estudios han mostrado que la combinación de la UF-VIT y la RE conduce a tasas de supervivencia mayores al 90%, similares a las observadas en ovocitos frescos, y notablemente mejores que las obtenidas en los protocolos convencionales. Además, se mantienen intactos parámetros como la integridad genética, la maduración nuclear y la calidad del huso meiótico, lo que refuerza aún más su potencial como una alternativa segura y eficaz para la práctica clínica (4,11). Un punto de especial interés es que la RE, obtuvo mayor número de blastocistos en día 5 de alta calidad (4-6AA/AB) y mayor número de tasas de embarazo clínico por transferencia de un único embrión. Esto podría ser explicado porque, al emplear menores concentraciones de disacáridos, reduce el estrés osmótico y la degeneración post-ICSI, mejorando la producción de blastocistos de alta calidad (18).

Los resultados más llamativos mostraron que las tasas de supervivencia embrionarias en la RE fueron idénticas a las de CD, sin embargo, resultó en una mejora en las tasas de embarazo en curso. También se observó un significativo incremento en las tasas de implantación, con menores tasas de aborto en el protocolo RE, en comparación con la



CD. Estos hallazgos resultan muy interesantes principalmente por dos razones. Primero, sugieren que la desvitrificación en un único paso, al menos en blastocistos humanos, puede ser perfectamente viable. Segundo, tiene implicaciones muy prácticas en términos de eficiencia y flujo de trabajo del laboratorio (14). En conjunto, la desvitrificación en un solo paso permite una rehidratación más rápida, junto con altas tasas de supervivencia embrionaria y la evidencia clínica es consistente al señalar que la RE proporciona ventajas relevantes frente a la CD.

Con todo ello, estos resultados indican que podríamos estar ante una nueva era en la manera de abordar la criopreservación ovocitaria y embrionaria. Por ejemplo, en 1998, cuando los ovocitos se vitrificaban a través de la congelación lenta, se tardaban 157 minutos para llevar a cabo todo el protocolo. Hoy en día, es posible hacerlo en 11 minutos, lo que podría ser reducido a 2 minutos si aplicáramos la UF-VIT. Esto supondría una reducción del tiempo de un 94% (10). Desde la perspectiva del embriólogo, este ahorro de tiempo es uno de los puntos más beneficiosos de los protocolos UF-VIT y RE. Para los ovocitos y embriones, la ventaja es evidente después de exponer estos resultados, entre los que se puede destacar menores tasas de degeneración post-ICSI y aborto, mayores tasas de supervivencia, de desarrollo a blastocisto e incluso mayores tasas de implantación y de embarazo en curso.

Otra perspectiva interesante respecto a la aplicación de estos protocolos ultrarrápidos es su posible impacto en el destino final de los embriones considerados de calidad baja o intermedia. Diversos factores, como la experiencia clínica o la propia decisión del embriólogo, suelen condicionar el hecho de si merece la pena congelar estos embriones o no, dado que presentan menores tasas de supervivencia a la vitrificación. Sin embargo, si estos nuevos protocolos demuestran un mayor potencial reproductivo tras la desvitrificación, su implementación generalizada podría favorecer la criopreservación de un mayor número de embriones de menor calidad, contribuyendo así al aumento de tasas de RNV.

En conclusión, teniendo en cuenta que tanto la vitrificación como desvitrificación de ovocitos y embriones se ha convertido en una parte esencial del laboratorio de TRA, la adopción de nuevos protocolos que puedan mejorar tanto los resultados a nivel clínico como el flujo de trabajo de laboratorio, serían más que bienvenidos (10).



## 6. CONCLUSIONES.

Tras la revisión de la evidencia bibliográfica y los resultados obtenidos, se puede extraer la siguiente conclusión principal: los protocolos ultrarrápidos de vitrificación (UF-VIT) y desvitrificación (RE) han demostrado ser una alternativa eficaz, reduciendo significativamente el tiempo de la exposición a los ACPs y mejorando la dinámica de trabajo del laboratorio. Se sustenta en las siguientes razones:

1. La toxicidad de los ACPs se ve acentuada en la C-VIT debido al mayor tiempo de exposición hacia los mismos. Es por ello por lo que la técnica UF-VIT/RE mejora los parámetros morfocinéticos, presentando una mayor densidad de microtúbulos, una menor agregación mitocondrial y una recuperación completa del huso meiótico.
2. La tasa de supervivencia de los ovocitos con el protocolo UF-VIT/RE es del 98%, muy cercana a la de los ovocitos en fresco y superior a la de los protocolos convencionales.
3. La efectividad de la UF-VIT no solo se queda en una mayor tasa de supervivencia tras la descongelación, sino que va más allá. Los resultados muestran las mismas o mayores tasas de formación de blastocistos que la C-VIT, una razón más para considerar su extensión en la aplicabilidad clínica.
4. En términos de resultados clínicos, los protocolos ultrarrápidos se han asociado a mayores tasas de implantación y de embarazo en curso en comparación con la rehidratación en múltiples pasos. Además, la aplicación de estos protocolos podría tener un impacto positivo en la criopreservación de embriones de baja calidad y aumentar las tasas acumuladas de RNV.
5. Las ventajas de la UF-VIT/RE no se sustentan solo en su eficiencia en comparación con las técnicas convencionales, sino en los beneficios que aporta la incorporación de este protocolo en la rutina del laboratorio, teniendo en cuenta que conllevaría prácticamente 10 menos veces el tiempo de lo que supone ahora.

En conjunto, estas conclusiones apoyan la incorporación de los protocolos UF-VIT/RE en la práctica clínica como una alternativa prometedora para superar las limitaciones históricas de la C-VIT/CD.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Mitchel C Schiewe, Robert E Anderson. Vitrification: the pioneering past to current trends and perspectives of cryopreserving human embryos, gametes and reproductive tissue. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. 2017;5(57). Disponible en: <https://doi.org/10.2147/BSAM.S139376>
2. A.Arav. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*. 2014;81(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.011>
3. Mínguez Y, Velasco JAG. Estado actual de la criopreservación Current status of cryopreservation. *Rev Iberoam Fert Rep Hum*. 2012.
4. Martinez-Rodero I, Gallardo M, Pisaturo V, Scarica C, Conaghan J, Liebermann J, et al. Shorter protocols for vitrification and post-warming dilution of human oocytes and embryos: a narrative review. *Reprod Biomed Online*; 2025;51(2):104857. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2025.104857>
5. Gook DA. History of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online*. septiembre de 2011;23(3):281-9. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.10.018>.
6. Samantha Pfeifer et al. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility and Sterility*. 2013;99(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.028>
7. Cho JR, Yu EH, Lee HJ, Kim IH, Jeong JH, Lee DB, et al. Ultra-Fast Vitrification: Minimizing the Toxicity of Cryoprotective Agents and Osmotic Stress in Mouse Oocyte Cryopreservation. *Int J Mol Sci*. 2024;25(3):1884. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms25031884>
8. Glujovsky D, Riestra B, Sueldo C, Fiszbajn G, Repping S, Nodar F, et al. Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. *Cochrane Gynaecology and Fertility Group, editor. Cochrane Database Syst Rev [Internet]*. 2014(9). Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD010047.pub2>
9. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res*. octubre de 2015;18(5):422-36. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>.
10. Liebermann J. The tortoise or the hare? Accelerating freezing and thawing. *Reprod Biomed Online*. 2025;50(4):104791. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2024.104791>.
11. Schiewe MC, Reichelderfer R, Wozniak K, De Romana C, Nordbak M, Baek K, et al. Ultra-fast vitrification and rapid elution of human oocytes: part I. germinal vesicle model validation. *Reprod Biomed Online*. 2024;49(6):104691. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2024.104691>
12. Wozniak K, Reichelderfer R, Ghaemi S, Hupp D, Fuzesi P, Ringler G, et al. Ultra-fast vitrification and rapid elution of human oocytes: Part II – verification of blastocyst development from mature oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2024;49(6):104690. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2024.104690>

13. Gallardo M, Saenz J, Risco R. Human oocytes and zygotes are ready for ultra-fast vitrification after 2 minutes of exposure to standard CPA solutions. *Sci Rep.* 2019;9(1):15986. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52014-x>
14. Liebermann, Juergen et al. Fast and furious: pregnancy outcome with one-step rehydration in the warming protocol for human blastocysts. *Reproductive BioMedicine.* 2024;48(4):103731 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.103731>
15. Shioya M, Hashizume R, Okabe-Kinoshita M, Kojima K, Nishi S, Nakano S, et al. One-step warming of vitrified human cleavage and blastocyst stage embryos does not adversely impact embryo survivability and subsequent developmental potential. *Hum Reprod.* 2025;40(2):261-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/humrep/deae283>
16. Kaskar K, Sieren KR, Brabner VM, Huneke BR, Vermilyea L, VerMilyea M, et al. Effect of Reducing the Vitrification and Warming Times on Blastocyst Survival and Pregnancy Rates. *Fertil Steril.* 2023;120(4):e143. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.08.439>
17. Schiewe MC. Comparative Re-Vitrification (rvtf) of Human Blastocysts Aimed at Validating Ultra-Fast Vitrification and Rapid (one-Step) Elution (re) Approaches. *Fertil Steril.* 2023;120(4):e113-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.08.367>
18. Kotliarova, O., Aydin, B., Dorofeyeva, U., Hudkova, D., Pylypenko, N., Vitushynska, M., Misyura, Y., Rozhak, N., Unsal, E., Kal, N. S., Kubaskova, T. M., & Babarikova, V. Optimizing morphokinetic embryo development: oocyte and embryo vitrification and thawing via ultra-rapid warming protocol. *Human Reproduction.* 2025; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deaf097.121>
19. Manns JN, Katz S, Whelan J, Patrick JL, Holt T, Merline AM, et al. Validation of a New, Ultra-Fast Blastocyst Warming Technique Reduces Warming Times to 1 Min and Yields Similar Survival and Re-Expansion Compared to Blastocysts Warmed Using a Standard Method. *Fertil Steril.* 2021;116(3):e165. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.07.456>
20. Kitazato IVF. Kitazato IVF. [citado 27 de agosto de 2025]. Medios de Vitricación Ultra-Fast. Disponible en: <https://kitazato-ivf.com/es/vitrificacion/medios-de-vitrificacion-ultra-fast/>