

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida

Vitrificación de ovocitos: metilación del
DNA y expresión génica

Autora: María Torres Used

Tutora: Eva Huguet Gutiérrez

Villaviciosa de Odón, octubre 2021

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	3
2. RESUMEN.....	4
3. ABSTRACT	5
4. INTRODUCCIÓN.....	6
4.1 La preservación de la fertilidad en la mujer.....	6
4.2 Criopreservación de ovocitos, de la congelación lenta a la vitrificación	6
4.3 Epigenoma en gametos y embriones.....	7
• ¿Qué es la epigenética?	7
• Reprogramación epigenética	8
• Impronta genómica.....	9
• Metilación y desmetilación del DNA	10
4.4 Expresión génica en el ovocito.....	11
4.5 Maduración ovocitaria y transición materno-cigótica.....	12
5. OBJETIVO	13
6. MÉTODOS	14
7. RESULTADOS.....	15
7.1 Efecto de la vitrificación de ovocitos sobre los niveles de metilación del DNA	15
7.2 Efecto de la vitrificación de ovocitos sobre los niveles de expresión de genes	18
8. ARGUMENTACIÓN CRÍTICA	24
9. CONCLUSIONES.....	33
10. BIBLIOGRAFÍA.....	34

1. ABREVIATURAS

BER: Mecanismo de reparación del DNA por escisión de bases (*Base Excision Repair*)

5caC: 5-carboxilcitosina

D: Día de desarrollo embrionario

DMR: Región diferencialmente metilada (*Differentially DNA-Methylated Region*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

DNMTs: Enzimas DNA metiltransferasas (*DNA Methyltransferases*)

5fC: 5-formilcitosina

FIV: Fecundación *in vitro*

5hmC: 5-hidroximetilcitosina

HSV: *High Security Vitrification Straw*

ICR: Centro regulador de la impronta (*Imprinting Control Region*)

ICSI: Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (*Intracytoplasmic Sperm Injection*)

Islas CpG: Citosinas y guaninas enlazadas por un fosfato

MII: Metafase II

5mC: 5-metilcitosina

MCI: Masa celular interna

MIV: Maduración *in vitro*

mRNA: RNA mensajero (*Messenger Ribonucleic Acid*)

N₂: Nitrógeno

O₂: Oxígeno

OPS: *Open Pulled Straw*

Res: Resveratrol

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

RTqPCR: PCR cuantitativa (q-PCR) con transcriptasa inversa (RT-PCR, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

TE: Trofoectodermo

TETs: Enzimas de traslocación diez-once (*Ten Eleven Translocation proteins*)

TRA: Técnicas de reproducción asistida

VG: Vesícula germinal

2. RESUMEN

En la actualidad, especialmente en el mundo desarrollado, el incremento en la demanda de técnicas de reproducción asistida, junto con las mejoras en las técnicas de criopreservación, están reconfigurando el panorama terapéutico en el tratamiento de la fertilidad. La técnica de vitrificación ovocitaria ha sido introducida como rutina en los laboratorios de embriología clínica. Dado el conocimiento actual su uso no implica ningún riesgo biológico conocido, sin embargo, sí sugiere precaución y la necesidad de un análisis adicional, puesto que estas técnicas son utilizadas durante un momento fisiológico de intensa reprogramación epigenética.

Los estudios sobre cómo la vitrificación de ovocitos puede repercutir en ellos y en los embriones procedentes de los mismos a nivel epigenético son escasos y de gran heterogeneidad, tanto en animal como humano. Tras la revisión del conjunto de literatura en el presente trabajo, se sugiere que los perfiles epigenéticos y transcriptómicos son sensibles al estrés inducido por la vitrificación de ovocitos en metafase II. La cual en modelos animales se encuentra asociada a hipometilación del DNA, pudiendo verse comprometido el posterior desarrollo embrionario temprano. Asimismo, los ovocitos desvitrificados muestran alterada la expresión de genes implicados en la metilación y desmetilación del DNA, así como de genes esenciales en la adquisición de competencia ovocitaria.

Dado que la epigenética es una rama de la ciencia que está empezando a emerger en el campo de la reproducción asistida se debe seguir profundizando en este nuevo enfoque, con el propósito de seguir mejorando la seguridad y eficacia de la vitrificación de ovocitos.

Palabras clave: Ovocito maduro, vitrificación, epigenética, metilación DNA, expresión génica.

3. ABSTRACT

Today, especially in the developed world, the increased demand for assisted reproduction techniques, together with improvements in cryopreservation techniques, are reshaping the therapeutic landscape in fertility treatment. Oocyte vitrification has been introduced as a routine in clinical embryology laboratories. Given the current knowledge its use does not imply any known biological risk, however, it does suggest caution and the need for further analysis, since these techniques are used during a physiological moment of intense epigenetic reprogramming.

Studies on how the oocyte vitrification can have an impact on them and on embryos obtained from them at the epigenetic level are scarce and of great heterogeneity, both in animals and humans. Following the review of the literature compiled in this paper, it suggests that epigenetic and transcriptomic profiles are sensitive to the stress induced by oocyte vitrification in metaphase II. In animal models oocyte vitrification is associated with hypomethylation of DNA and the early embryonic development may be compromised. Moreover, in devitrified MII oocytes the expression of genes involved in the methylation and demethylation of DNA was modified, as well as the expression of genes essential in the acquisition of oocyte competence.

Since epigenetic is a branch of science that is beginning to emerge in the field of assisted reproduction, this new approach should be studied further in order to improve the safety and efficacy of oocyte vitrification.

Key words: mature oocyte, vitrification, epigenetics, DNA methylation, gene expression.

4. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, especialmente en el mundo desarrollado, se ha producido una creciente demanda por las técnicas de reproducción asistida (TRA) debido a diversos factores: su mayor eficacia, los cambios sociales en los conceptos de familia-paternidad-maternidad, el mayor poder adquisitivo y el aumento de la esterilidad en ambos sexos (1). Todo ello unido a las mejoras en las técnicas de criopreservación están reconfigurando el panorama terapéutico en el tratamiento de la fertilidad.

4.1 La preservación de la fertilidad en la mujer

La preservación de la fertilidad en la mujer ha recibido considerable atención en los últimos años, entendiéndose por ello, las intervenciones médicas destinadas a mantener la fertilidad en una paciente cuya capacidad de ser madre se ve comprometida, ya sea por razones "sociales" o médicas. Aunque la principal indicación para ello se reservaba originalmente a mujeres con cáncer que fueran a requerir un tratamiento que pudiera tener como consecuencia una falla de la función ovárica (1). Su uso se ha expandido para incluir un sinnúmero de escenarios, entre los que destacan: la donación de ovocitos, pacientes que optan por acumular sus ovocitos en ciclos consecutivos de estimulación ovárica para aumentar las oportunidades y probabilidades de éxito futuro de las TRA, pacientes transgénero o el retraso de la maternidad, una tendencia cada vez más marcada en la sociedad. En este último caso, muchas mujeres tienen dificultades para lograr un embarazo por la disminución de la reserva ovárica asociada a la edad (1). Por lo que la criopreservación de ovocitos ofrece a mujeres jóvenes fértiles, sin deseos de ser madres en ese momento, la posibilidad de ser sus propias donantes en el futuro. Es cierto que los embarazos a una edad avanzada suponen un mayor riesgo, pero se pueden esperar buenos resultados en ausencia de complicaciones médicas de base y con un adecuado manejo obstétrico.

4.2 Criopreservación de ovocitos, de la congelación lenta a la vitrificación

La criopreservación de ovocitos evita todos los cuestionamientos éticos y morales de la criopreservación embrionaria. En 1986, se reportó el primer recién nacido vivo humano de un ovocito criopreservado y descongelado. La congelación lenta durante años ha sido el método de elección para preservar embriones, con resultados satisfactorios de supervivencia y gestación clínica. Sin embargo, esos mismos procedimientos perdían eficacia al ser utilizados con ovocitos. El ovocito maduro en metafase II (MII) tiene los cromosomas localizados en el huso y desprovistos de membrana celular lo que le confiere una mayor inestabilidad (1).

La vitrificación es una técnica de reciente implantación en la mayoría de laboratorios de embriología que revolucionó completamente el campo de la criopreservación. A grandes rasgos, se basa en una rápida deshidratación utilizando un medio de congelación hiperosmolar y una velocidad de enfriamiento muy elevada. La combinación de crioprotectores más utilizada es etilenglicol, dimetilsulfóxido y sacarosa (1). Se han diseñado diferentes soportes especiales de carga de las células para su conservación en nitrógeno (N₂) líquido. Entre ellos podemos encontrar sistemas cerrados como HSV (*High Security Vitrification Straw*) o Cryotip; y sistemas abiertos como OPS (*Open Pulled Straw*) o Cryotop.

Uno de los puntos más conflictivos fue determinar el momento idóneo para criopreservar los ovocitos. A favor de vitrificar en estadio de VG (vesícula germinal) se encuentra el hecho de que la cromatina no se halla empaquetada en forma de cromosomas y además se encuentra protegida por la membrana nuclear. Inicialmente se consideraba que esta configuración podría resistir mejor los efectos del crioprotector. Sin embargo, posteriormente se ha descubierto que los ovocitos vitrificados en VG maduran un 20% menos que las VG que no han sido vitrificadas. Además, los embriones procedentes de ovocitos vitrificados en VG poseen menor calidad que los procedentes de ovocitos vitrificados en MII (1). Finalmente, se ha concluido que vitrificar en VG no es la estrategia ideal para obtener los mejores resultados en un ciclo de reproducción. Por ello, en la presente revisión quedaron excluidos aquellos estudios que vitrifican en estadio de VG, ya que actualmente su utilidad en la práctica clínica es muy reducida. Igualmente, los resultados obtenidos tampoco serían comparables con los estudios que vitrifican en MII, ya que los ovocitos se encuentran en estadios madurativos diferentes.

4.3 Epigenoma en gametos y embriones

- ¿Qué es la epigenética?

Conrad Waddington fue el primero en emplear el término epigenética en 1942 para describir cómo, durante el proceso de desarrollo, un genotipo produce un fenotipo. La raíz griega “epi” significa “sobre” o “por encima”; la epigenética ha pasado a representar la herencia de variación por encima y más allá de diferencias en la secuencia de DNA. En la actualidad se define como “los cambios heredables en la función génica que se producen sin modificar la secuencia de nucleótidos del DNA” (2). Estos cambios pueden explicarse en base a moléculas de RNA, metilación del DNA y modificaciones postraduccionales de histonas. Estas 2 últimas modificaciones covalentes actúan conjuntamente modificando la conformación de la cromatina.

El DNA de células eucariotas se encuentra empaquetado mediante la formación de nucleosomas que consisten en 146 pares de bases, organizadas alrededor de un octámero de 4 proteínas histonas (H2A, H2B, H3 y H4) (2). Dependiendo del estado de metilación del DNA, así como de modificaciones represoras o activadoras de las proteínas histonas, la cromatina adopta una conformación cerrada (heterocromatina) o abierta (eucromatina) (**Figura 1**). La heterocromatina se asocia a represión génica, el DNA se encuentra inaccesible a la maquinaria de transcripción, mientras que la eucromatina permite la expresión (2).

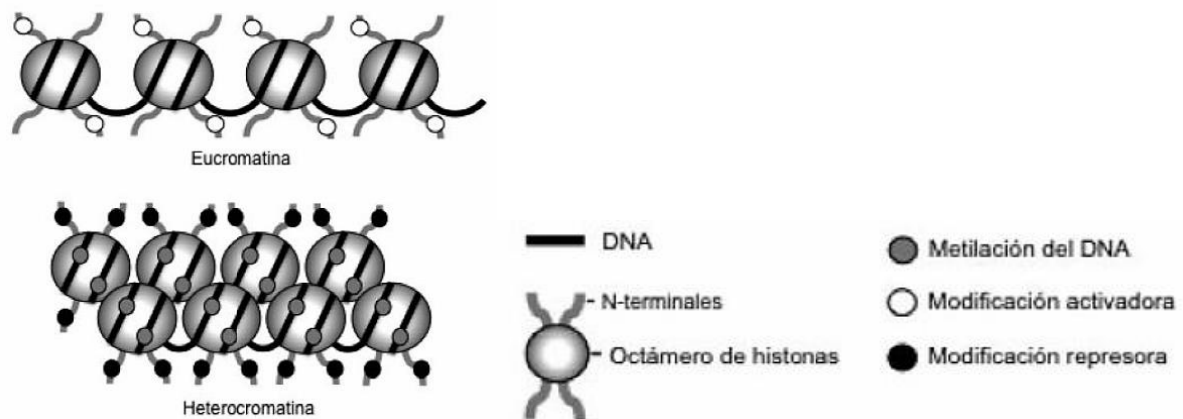


Figura 1: Esquema de las modificaciones epigenéticas en el DNA y en las proteínas histonas relacionadas con el estado de la cromatina en forma de eucromatina o heterocromatina (2).

- Reprogramación epigenética

Después de la fecundación, el cigoto resultante hereda la copia materna y paterna de todos los genes del genoma, los cuales deben transmitirse de forma fiel a lo largo de la posterior proliferación celular, asegurando que todas las células del organismo compartan la misma información genética. Para el desarrollo es también imprescindible la diferenciación celular. Siendo las modificaciones epigenéticas, que regulan la expresión génica, las responsables de las diferencias morfológicas y funcionales entre diferentes tipos celulares que comparten un mismo genoma (2).

Tras la fecundación y durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, los patrones epigenéticos específicos de ovocito y espermatozoide son eliminados mediante una desmetilación global de ambos genomas. En el estadio de blastocisto, emergen los patrones epigenéticos específicos de cada tipo celular (**Figura 2A**). Los cuales deben ser transmitidos a

través de la mitosis, para conservar el estado de diferenciación y funcionalidad en las células hijas (2).

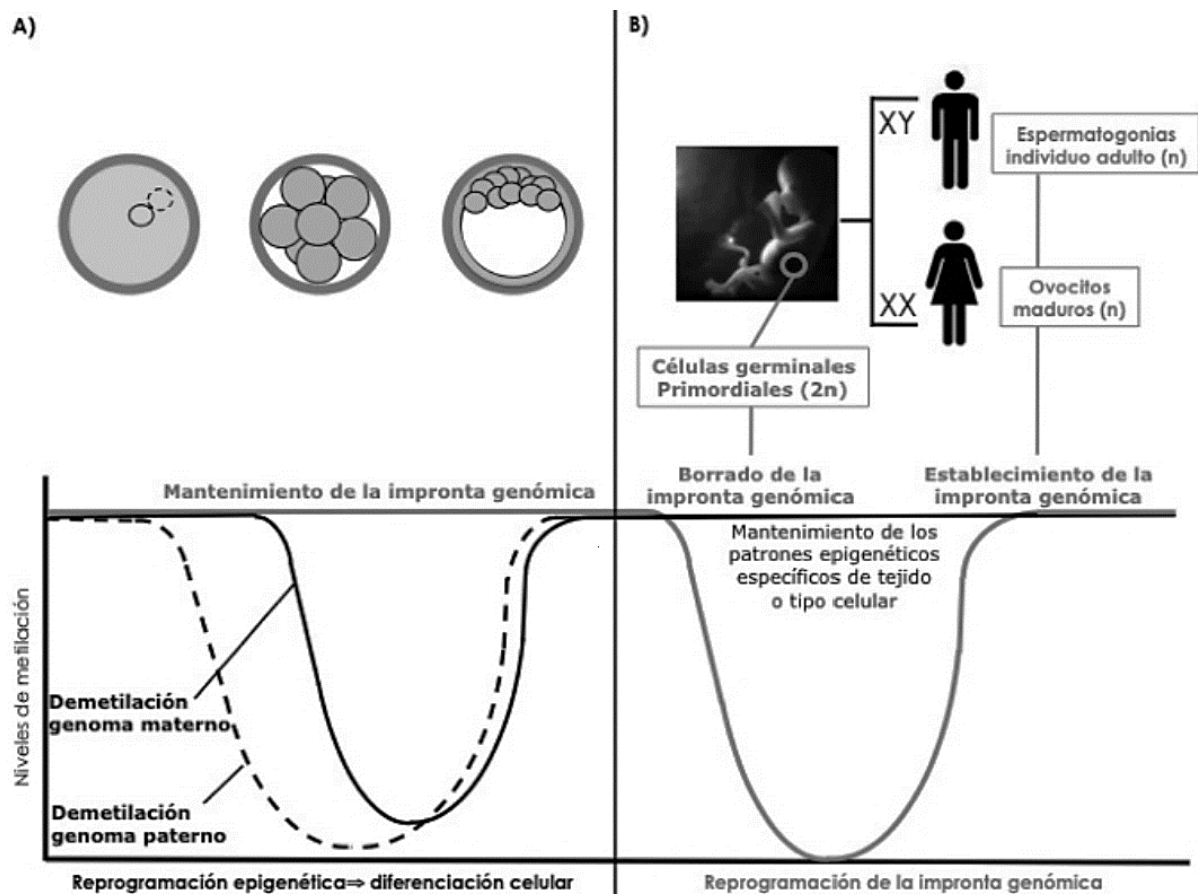


Figura 2: Reprogramación epigenética durante los primeros estadios del desarrollo embrionario (A) y reprogramación de la impronta genómica en la línea germinal (B). En negro se indican los niveles de metilación global del genoma y en gris los niveles de metilación de los genes regulados por impronta genómica (2).

- Impronta genómica

El término epigenética engloba la impronta genómica (en inglés, *imprinting*), un sistema de regulación de la expresión génica presente en especies de gestación intrauterina. Se basa en marcar diferencialmente con modificaciones epigenéticas determinados genes en función de su origen parental, de manera que solo se expresa el alelo materno o paterno.

A pesar de la flexibilidad epigenética, que permite la diferenciación celular, los patrones epigenéticos que controlan la expresión monoalélica de genes regulados por impronta genómica

son comunes en todos los tipos celulares, y es crucial que se mantengan desde la fecundación y a lo largo de las primeras etapas de la embriogénesis, para el correcto desarrollo embrionario, neurológico y de los tejidos extraembrionarios. (**Figura 2A**). Por lo tanto, la metilación diferencial de alelo de los genes regulados por impronta genómica debe ser heredada de ovocitos y espermatozoides, y debe mantenerse o protegerse frente a la desmetilación global que permite la reprogramación epigenética del genoma (2). Para asegurar la transmisión de la metilación monoalélica de estos genes, en las células germinales primordiales la impronta genómica se borra, y se establecen los patrones de metilación específicos de alelo de los genes regulados por impronta genómica durante la gametogénesis, en función del sexo (**Figura 2B**). Por tanto, aquellos genes en los que su patrón de impronta se correlaciona con metilación materna, esta se establecerá durante la ovogénesis en todos los ovocitos. En el caso de los genes en los que su patrón de impronta se correlaciona con metilación paterna, esta se establecerá durante la espermatogénesis (2). De este modo, todos los ovocitos y espermatozoides serán portadores de la impronta específica de alelo para cada uno de los genes regulados por impronta genómica, asegurando su posterior expresión monoalélica durante el desarrollo.

Los genes regulados por impronta genómica suelen encontrarse agrupados en dominios cromosómicos. La expresión monoalélica de todos los genes agrupados en un determinado dominio se encuentra bajo el control de una única región, el centro regulador de la impronta (ICR, *Imprinting Control Region*). Las ICR del genoma se corresponden con lo que se conoce como región diferencialmente metilada (DMR, *Differentially DNA-Methylated Region*). Estas regiones del genoma contienen islas CpG (citosinas y guaninas enlazadas por un fosfato) y en ellas se establece la metilación del DNA y las modificaciones represoras de histonas que conllevan la heterocromatización de toda la región de forma específica de alelo (2).

- Metilación y desmetilación del DNA

La marca epigenética más común en el genoma humano es la metilación del DNA. Este mecanismo hace referencia a un proceso bioquímico en el que se produce la adición de grupos metilo a las bases nucleotídicas. En los eucariontes, el tipo predominante es la metilación de bases de citosina adyacentes a nucleótidos de guanina, denominados dinucleótidos CpG. Se agrega un grupo metilo del donante S-adenosil metionina al carbono 5 de la citosina (5mC). La adición de grupos metilo en los dinucleótidos CpG es catalizada por la familia de enzimas DNA metiltransferasas (Dnmts, *DNA Methyltransferases*).

En mamíferos, se han identificado cuatro Dnmts activas: Dnmt1 es esencial en el mantenimiento del patrón de metilación del DNA en la replicación a través de la división celular; Dnmt3a y Dnmt3b llevan a cabo la metilación de *novο* estableciendo nuevos patrones de metilación; Dnmt3l carece de actividad enzimática, pero tiene un papel regulador uniéndose a Dnmt3a, sin embargo, en humanos no parece ser necesaria para la metilación (3).

La desmetilación del DNA puede darse de forma pasiva o activa. Se da de forma pasiva en caso de que la Dnmt1 se encuentre inactiva durante el proceso de replicación del DNA, de modo que las cadenas hemimetiladas no son reconocidas y no se establece la metilación en la cadena naciente. De modo que, durante las sucesivas replications la metilación de la cadena inicial no se copia y se va perdiendo de forma pasiva. Sin embargo, en el proceso de vitrificación de ovocitos y embriones la replicación no tiene lugar y es la desmetilación activa la que juega un papel primordial (4). La cual es llevada a cabo por la acción de las enzimas de traslocación diez-once Tet1, Tet2 y Tet3 (*Ten Eleven Translocation proteins*), mediante la oxidación secuencial de 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC), y finalmente, 5-carboxilcitosina (5caC). Estos tres derivados de la 5mC son reconocidos y eliminados por la enzima DNA glicosilasa, capaz de escindir la base nitrogenada del nucleótido dañado. Posteriormente, es reparado mediante el sistema de reparación del DNA por escisión de bases (BER, *Base excision Repair*) sustituyéndola por una nueva base C libre de modificaciones.

4.4 Expresión génica en el ovocito

En las células eucariotas, las moléculas de mRNA se encuentran ampliamente distribuidas por el citoplasma, tras su síntesis previa en el núcleo por transcripción de la molécula de DNA. El mRNA obtenido después de la transcripción se conoce como RNA transcrito primario o pre-mRNA. En la mayoría de los casos no se libera del complejo de transcripción en forma totalmente activa, sino que ha de sufrir una serie de modificaciones en el núcleo celular antes de poder ejercer su función, lo que se conoce como procesamiento o maduración del mRNA. El cual se inicia con la unión de la caperuza, un nucleótido modificado de guanina (7-metilguanosina), al primer nucleótido del pre-mRNA mediante un enlace 5'-5' trifosfato. Esta caperuza es fundamental para aumentar estabilidad del mRNA y facilitar la unión del ribosoma al extremo 5' del mRNA durante el proceso de traducción. A continuación, tiene lugar la poliadenilación que consiste en la adición al extremo 3' de la cola de poli(A), una secuencia larga de poliadenilato. La cual facilita la unión del ribosoma al mRNA y confiere estabilidad a

la molécula, lo que aumenta el tiempo durante el cual el mRNA permanece intacto y disponible para la traducción antes de ser degradado por enzimas celulares.

Además, tiene lugar un proceso de corte y empalme conocido como *splicing*, en el que el pre-mRNA sufre la eliminación de los intrones (secuencias no codificantes) y conexión o empalme de los exones (secuencias codificantes) originando un mRNA maduro. Además, un único pre-mRNA puede procesarse de diferentes maneras (*splicing* alternativo) para producir tipos alternativos de mRNA, lo que determina la síntesis de diferentes proteínas a partir de la misma secuencia de DNA. Finalmente, el mRNA maduro a través de poros de la envoltura nuclear es transportado al citosol de la célula, donde será reconocido por los ribosomas, maquinaria encargada de la síntesis proteica mediante el proceso de traducción.

4.5 Maduración ovocitaria y transición materno-cigótica

La maduración ovocitaria, entendida como el reinicio del ciclo meiótico, la reorganización del ooplasma y la regulación de la expresión génica, es fundamental para sustentar el desarrollo temprano de los embriones. A esta capacidad de lograr el desarrollo se la denomina competencia. La adquisición de competencia nuclear y citoplásmica en el ovocito ocurre durante dos fases: en la primera, de crecimiento, se producen modificaciones moleculares y reorganización de orgánulos en el ooplasma; en la segunda, justo antes de la ovulación, se produce el reinicio de la meiosis y el ovocito queda detenido en metafase II hasta el momento de la fecundación. La mayor o menor competencia de desarrollo de los ovocitos depende de la síntesis y acumulación de mRNA y proteínas maternas durante la ovogénesis. Siendo la menor competencia de desarrollo de los ovocitos una de las principales razones del fracaso de la FIV (fecundación *in vitro*) (5).

Una vez fecundado el óvulo y durante las primeras divisiones embrionarias, los transcritos de origen materno irán desapareciendo gradualmente, comenzando así la transición materno-cigótica. Este evento de degradación del 90% de los transcritos maternos ocurre fundamentalmente en el estadio de 4 células (6). El resultado de esta transición es la expresión de los genes del embrión, alcanzando el pico de máxima expresión en la etapa de 8 células, lo que señala la activación del genoma del cigoto (6). La transición materno-cigótica es esencial ya que coordina la división celular y la activación de genes del cigoto, con el objetivo de preparar al embrión para la diferenciación celular y posterior desarrollo. Problemas durante esta etapa puede acarrear el bloqueo de los embriones y su degeneración (6).

5. OBJETIVO

Las TRA son reconocidas generalmente como seguras, sin embargo, son varios los estudios que muestran que los niños nacidos mediante ellas presentan un incremento moderado del riesgo de: bajo peso al nacer, defectos de nacimiento, trastornos del crecimiento y metabólicos, retrasos psicomotores o del desarrollo mental (7). Y más específicamente, un aumento en la aparición de enfermedades raras relacionadas con la impronta genómica (8). La cuestión, aún sin resolver, reside en si este riesgo adicional está relacionado con el empleo de TRA o con los factores biológicos intrínsecos asociados a la infertilidad. Una de las principales hipótesis que se postulan es que estas técnicas puedan tener un efecto sobre el epigenoma de gametos y embriones, ya que son utilizadas durante un momento fisiológico de intensa reprogramación epigenética (2).

Pese al gran potencial de la congelación de ovocitos dentro de las TRA, durante mucho tiempo las dificultades técnicas han sido enormes. Los protocolos tradicionales utilizados en el laboratorio para congelar ovocitos no ofrecían resultados satisfactorios (1). Por esa razón en los últimos años se ha suscitado un interés creciente en optimizar los protocolos de criopreservación, buscando proporcionar condiciones óptimas para su supervivencia, desarrollo y mejora de resultados clínicos. Lo que ha derivado finalmente en la introducción de la técnica de vitrificación ovocitaria como rutina en los laboratorios de embriología clínica (1). Dado el conocimiento actual su uso no implica ningún riesgo biológico conocido, sin embargo, sí sugiere precaución y la necesidad de un análisis adicional desde el punto de vista de la epigenética. Ya que es una rama de la ciencia que está empezando a emerger en el campo de la reproducción asistida y de la que hasta ahora sólo se ha podido vislumbrar la punta del iceberg.

Los estudios sobre cómo la vitrificación de ovocitos puede repercutir en ellos y en los embriones procedentes de los mismos a nivel epigenético son escasos y de gran heterogeneidad. Siendo el objetivo del presente Trabajo Fin de Máster realizar una breve revisión de dichos estudios, tanto en animal como humano, para saber en qué punto del conocimiento se encuentra la investigación y poder seguir profundizando en este nuevo enfoque, antes desconocido. Y que es necesario valorar con el propósito de seguir mejorando la seguridad y eficacia de la vitrificación de ovocitos.

6. MÉTODOS

La búsqueda bibliográfica se realizó durante el periodo comprendido entre el 1 de marzo de 2021 y el 18 de mayo de 2021. Para la búsqueda se utilizaron las bases de datos de PubMed, Web of Science (WOS) y Scopus2; además, se buscó material complementario de acceso online en la Biblioteca CRAI Dulce Chacón de la Universidad Europea de Madrid. La estrategia de búsqueda incluyó palabras relacionadas con la vitrificación de ovocitos, epigenética, metilación del DNA y expresión génica.

En primer lugar, se llevó a cabo una búsqueda generalizada en Google Académico de documentos y guías de práctica clínica publicados por diferentes sociedades y asociaciones profesionales tanto a nivel nacional como internacional sobre epigenética y criopreservación en el contexto de la reproducción asistida. Esta búsqueda se hizo tanto en español como en inglés. Después, se realizó una búsqueda general de la literatura científica en inglés en la base de datos PubMed mediante la ecuación de búsqueda: oocyte vitrification AND epigenetic, sin límite de fecha. También se consultaron como apoyo otras bases de datos (WOS y Scopus2).

Una vez enmarcado el contexto general, se fue acotando la bibliografía mediante las ecuaciones de búsqueda: oocyte vitrification AND DNA methylation; oocyte vitrification AND gene expression, entre los años 2010-2020. Además, se analizaron las referencias bibliográficas de los artículos seleccionados con el fin de rescatar otros estudios potencialmente incluíbles para la revisión.

Se excluyeron todos aquellos artículos que vitrificaron en VG y posteriormente realizaron maduración *in vitro* (MIV). Los criterios de inclusión y exclusión se encuentran recogidos a continuación:

<p>Criterios de inclusión</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Publicaciones en inglés y español. 2. Estudios enfocados y relacionados con la vitrificación de ovocitos y modificaciones epigenéticas (metilación del DNA y expresión génica). 3. Estudios en animales y humanos.
<p>Criterios de exclusión</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Artículos no disponibles/localizables. 2. Publicaciones anteriores al año 2010 3. Cartas al editor. 4. Conferencias. 5. Estudios que vitrifican ovocitos en estadio de VG y posteriormente realizan MIV.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la vitrificación de ovocitos sobre los niveles de metilación del DNA

La metilación del DNA es una de las modificaciones epigenéticas que mayor atención ha recibido en los últimos años. Existe gran heterogeneidad en cuanto a los parámetros estudiados, al hablar de metilación se pueden incluir patrones de metilación de las islas CpG de los promotores de: genes pluripotenciales, genes que codifican para enzimas clave en los procesos de metilación o acetilación, genes sometidos a impronta. Existe un sinnúmero de posibilidades. En esta revisión se abarcó exclusivamente niveles globales de metilación del DNA.

En humanos existen muy pocos estudios y a esto se suma que varios de ellos vitrificaron los ovocitos en estadio de VG y tras su desvitrificación realizaron MIV, estudios excluidos de esta revisión. De Munck et al. (9) analizaron varios aspectos claves en relación a la seguridad de la vitrificación de ovocitos humanos, uno de ellos fue el patrón global de metilación e hidroximetilación del DNA en embriones a día 3 de desarrollo (D3), derivados de una microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *Intracytoplasmic Sperm Injection*) en ovocitos MII desvitrificados y ovocitos MII frescos como grupo control. No

encontraron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad media de fluorescencia para 5mC ni para 5hmC (**Tabla 1**).

Tabla 1

Efecto de la vitrificación de ovocitos sobre los niveles de metilación del DNA

Referencia	Modelo de estudio	Materiales	Técnica empleada	Secuencia estudiada	Conclusión
Liang et al. (11)	Murino	MII frescos y MII desvitrificados; Embriones (D2-D8) procedentes de MII frescos y desvitrificados	Inmunofluorescencia	5mC	Los ovocitos MII desvitrificados, así como los embriones procedentes de MII desvitrificados hasta el estadio de 8 células, mostraron niveles menores de 5mC en comparación con MII frescos
De Munck et al. (9)	Humano	Embriones (D3) procedentes de MII frescos y MII desvitrificados	Inmunofluorescencia	5mC 5hmC	Sin diferencias significativas
Chen et al. (10)	Bovino	MII frescos y MII desvitrificados; Embriones (D2-D8) procedentes de MII frescos y desvitrificados	Inmunofluorescencia	5mC	Los ovocitos MII desvitrificados, así como los embriones procedentes de MII desvitrificados hasta el estadio de 8 células, mostraron niveles menores de 5mC en comparación con MII frescos. Los blastocistos procedentes de MII desvitrificados a nivel de TE mantuvieron niveles menores de 5mC. Sin embargo, a nivel de la MCI no hubo diferencias entre ambos grupos
Chen et al. (12)	Murino	MII frescos y MII desvitrificados	Inmunofluorescencia	5mC	Los ovocitos MII desvitrificados mostraron niveles menores de 5mC en comparación con MII frescos
Cao et al. (13)	Murino	Embriones (D2-D8) procedentes de MII frescos y MII desvitrificados	Inmunofluorescencia	5mC 5hmC	Los embriones procedentes de MII desvitrificados desde el estadio de 8 células hasta blastocisto expandido mostraron niveles menores de 5hmC en comparación con MII frescos. Sin diferencias en los niveles de 5mC.
Fu et al. (4)	Murino	MII frescos y MII desvitrificados	Inmunofluorescencia	5mC 5hmC	Los ovocitos MII desvitrificados mostraron niveles menores de 5mC y 5hmC en comparación con MII frescos

Dada la escasa bibliografía existente en humanos se tomó como base los hallazgos en modelos animales. Chen et al. (10) en bovino, Liang et al. (11) y más recientemente, Chen et al. (12) en ratón, mostraron que los ovocitos MII desvitrificados presentaban una reducción significativa en los niveles de 5mC, así como a una reducción en los niveles de 5hmC según Fu et al. (4), en comparación con el grupo control de ovocitos MII frescos (**Tabla 1**). Al alargarse el periodo de estudio hasta el estadio de blastocisto, tras realizar una FIV de ovocitos MII desvitrificados y frescos, en los embriones procedentes de MII desvitrificados los niveles de fluorescencia para 5mC fueron menores hasta el estadio de 8 células y a partir de mórula los niveles se igualaron a los de embriones procedentes de MII frescos (10, 11), ver **Tabla 1**.

Además, Chen et al. (10) reportaron que en los blastocistos procedentes de MII desvitrificados, en los cuales distinguieron entre TE (Trofooctodermo) y MCI (Masa celular interna), a nivel de TE los niveles de 5mC fueron menores, pero sin diferencias a nivel de la MCI, en comparación con el grupo control de blastocistos procedentes de MII frescos (**Figura 4**).

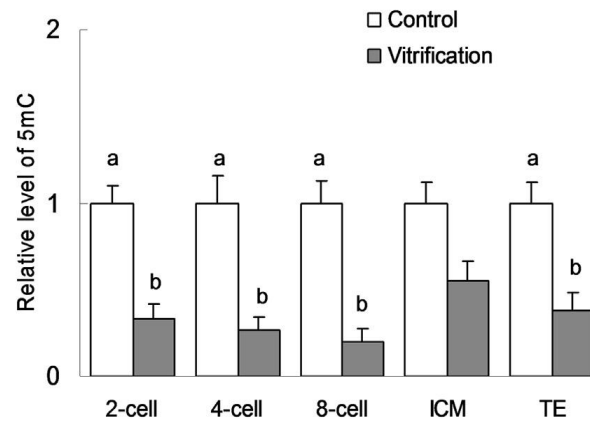


Figura 4. Niveles globales de 5mC en etapas tempranas del desarrollo embrionario en bovino. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la señal de 5mC. La intensidad de fluorescencia está expresada en base a la fijada para los embriones del grupo control con un valor de 1. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar y las diferentes letras en las barras indican una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos ($p < 0,05$). Las barras de color blanco representan el grupo control de ovocitos MII frescos y las barras de color negro el grupo de ovocitos MII desvitrificados mediante el uso del sistema de vitrificación Cryotop (10).

Más recientemente, Cao et al. (13) también alargaron el periodo de estudio hasta el estadio de blastocisto, tras realizar la FIV de MII desvitrificados y frescos, pero en este caso en los embriones procedentes de MII desvitrificados no encontraron diferencias para los niveles de fluorescencia de 5mC, pero sí para los de 5hmC, los cuales fueron menores desde el estadio de 8 células hasta blastocisto expandido en comparación con el grupo de embriones procedentes de MII frescos, ver **Tabla 1**

7.2 Efecto de la vitrificación de ovocitos sobre los niveles de expresión de genes

La hipometilación aberrante del DNA puede provocar la inestabilidad del genoma y el desarrollo anormal de ovocitos y embriones (4). Es por ello que varios estudios en modelos animales, especialmente en ratón, se hayan centrado en investigar los niveles de expresión de enzimas clave en los procesos de metilación y desmetilación del DNA como son las Dnmts y Tets, respectivamente.

Uno de los primeros estudios al respecto fue realizado por Zhao et al. (14) quienes demostraron mediante RTqPCR (PCR cuantitativa con transcriptasa inversa) que la vitrificación de ovocitos MII de ratón disminuía significativamente ($p < 0.05$) el nivel de expresión de DNMT1 (**Tabla 2**). Un año más tarde, Cheng et al. (15) corroboraron lo descubierto por Zhao et al. (14) y ampliaron el estudio, incluyendo más variantes (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L). En los ovocitos MII desvitrificados los niveles de expresión de DNMTs disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) en comparación con los niveles de MII frescos (**figura 5**).

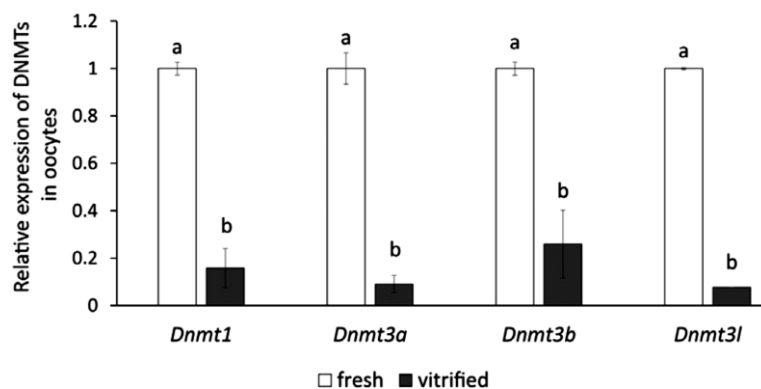


Figura 5. Niveles de expresión de DNMTs a nivel de mRNA en ovocitos MII de ratón mediante RTqPCR. Los datos se muestran como la media \pm error estándar y las diferentes letras en las barras indican una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos ($p < 0,05$). Las barras de color blanco representan ovocitos MII frescos y las barras de color negro ovocitos MII desvitrificados mediante el uso del sistema de vitrificación OPS. * En Dnmt3l, las barras de error son demasiado pequeñas para poder observarse (15).

En ese mismo estudio (15), tras realizar una FIV de ovocitos de ratón MII desvitrificados y frescos, quisieron conocer si también la expresión de los genes DNMTs se veía disminuida en estadio de blastocisto. Los blastocistos procedentes de MII desvitrificados mostraron

únicamente un menor nivel de expresión para DNMT3B ($p < 0.05$) en comparación con los blastocistos procedentes de MII frescos. Sin embargo, en bovino la variante afectada fue otra, los blastocistos procedentes de MII desvitrificados mostraron un menor nivel de expresión para DNMT3A ($p < 0.05$) (10).

En el proceso de vitrificación de ovocitos y embriones no se producen eventos de replicación, de ahí que la desmetilación activa juegue un papel primordial en la hipometilación del DNA. Por ello varios estudios en modelos animales, más concretamente en ratón, se centraron en investigar si también la expresión de las enzimas Tets, implicadas en la desmetilación activa del DNA, se ve afectada por la vitrificación ovocitaria. Se ha demostrado que estas enzimas afectan a la metilación del DNA en embriones y ovocitos de una manera oxidativa; sin embargo, no fue hasta hace poco cuando este efecto y el cambio en los niveles de expresión de genes TETs se midieron en ovocitos MII desvitrificados.

En 2019, Fu et al. (4) mediante RTqPCR determinaron el nivel de expresión de TET1, TET2 y TET3 en ovocitos MII de ratón desvitrificados y frescos. En los ovocitos MII desvitrificados se produjo un aumento significativo en el nivel de expresión de TET2 y TET3. A su vez mediante inmunofluorescencia midieron el nivel de expresión de proteínas Tets, detectando únicamente un aumento significativo ($p < 0.01$) en el nivel de Tet3 respecto a MII frescos (**Tabla 2**).

En ese mismo año, de forma similar Cao et al. (13) estudiaron los cambios producidos por la vitrificación ovocitaria en la expresión de genes TETs, tanto en ovocitos MII como en embriones en diferentes etapas de desarrollo tras la FIV de MII desvitrificados y frescos. Al contrario que Fu et al. (4), los ovocitos MII desvitrificados mostraron un menor nivel de expresión para TET2 en comparación con MII frescos (**Tabla 2**). Al ampliar el periodo de estudio hasta blastocisto, los embriones procedentes de MII desvitrificados sufrieron una reducción significativa ($p < 0,05$) en la expresión de TET1 en el estadio de 4 a 8 células, así como un aumento significativo ($p < 0,05$) en la expresión de TET2 en estadio mórula.

En conjunto, los resultados obtenidos principalmente en ratón, muestran cómo la vitrificación de ovocitos en MII altera el patrón de expresión de las enzimas responsables de la metilación (Dnmts) y desmetilación (Tets) del DNA, tanto en los propios ovocitos como a lo largo del desarrollo embrionario temprano.

Tabla 2*Efecto de la vitrificación de ovocitos sobre los niveles de expresión de genes en modelo animal*

Referencia	Modelo animal	Materiales	Técnica empleada	Secuencia estudiada	Conclusión
Zhao et al. (14)	Murino	MII frescos y MII desvitrificados	RTqPCR	DNMT1	En ovocitos MII desvitrificados disminuyó la expresión de DNMT1
Cheng et al. (15)	Murino	MII frescos y MII desvitrificados; Embriones (D2-D8) procedentes de MII frescos y desvitrificados	RTqPCR	DNMT1 DNMT3A DNMT3B DNMT3L	En ovocitos MII desvitrificados disminuyó la expresión de DNMTs. Además, los blastocistos procedentes de MII desvitrificados mostraron una expresión menor de DNMT3B
Dai et al. (16)	Porcino	MII frescos y MII desvitrificados	RTqPCR	DNM1 SOD1 MFN2 BAX BCL2	En ovocitos MII desvitrificados aumentó la expresión de DNM1 y se redujo la expresión de SOD1, MFN2, BAX y BCL2
Chen et al. (10)	Bovino	Embriones (D2-D8) procedentes de MII frescos y desvitrificados	RTqPCR	DNMT1 DNMT3A DNMT3B	Los blastocistos procedentes de MII desvitrificados mostraron una expresión menor de DNMT3A
Fu et al. (4)	Murino	MII frescos y MII desvitrificados	RTqPCR *Inmunofluorescencia	TET1 TET2 TET3	En ovocitos MII desvitrificados aumentó la expresión de TET2 Y TET3. Junto con un acúmulo significativo de la proteína Tet3
Cao et al. (13)	Murino	MII frescos y MII desvitrificados; Embriones (D2-D8) procedentes de MII frescos y desvitrificados	RTqPCR	TET1 TET2 TET3	En ovocitos MII desvitrificados disminuyó la expresión de TET2. En embriones procedentes de MII desvitrificados la expresión de TET1 disminuyó en el estadio de 4-8 células y la expresión de TET2 aumentó en estadio de mórula. Sin diferencias para TET3
Chen et al. (12)	Murino	MII frescos y MII desvitrificados; Embriones (D2-D8) procedentes de MII frescos y desvitrificados	RTqPCR *Western Blot	IGF2R PEG3 SIRT1 GTL2 PEG10 H19 IGF2	En ovocitos MII desvitrificados aumentó la expresión de GTL2 y PEG10; y disminuyó la expresión de IGF2R, PEG3 y SIRT1. Además, los niveles de la proteína Sirt1 se vieron disminuidos. En embriones de 2 células procedentes de MII desvitrificados se vio alterada la expresión de PEG3, GTL2 y PEG10. Sin diferencias para H19 e IGF2

Asimismo, en otros modelos animales como porcino (16) la vitrificación de ovocitos en MII alteró la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial (DNM1, SOD1, MFN2) y disminuyó la expresión de genes relacionados con la apoptosis (BAX y BCL2), ver **figura 6**.

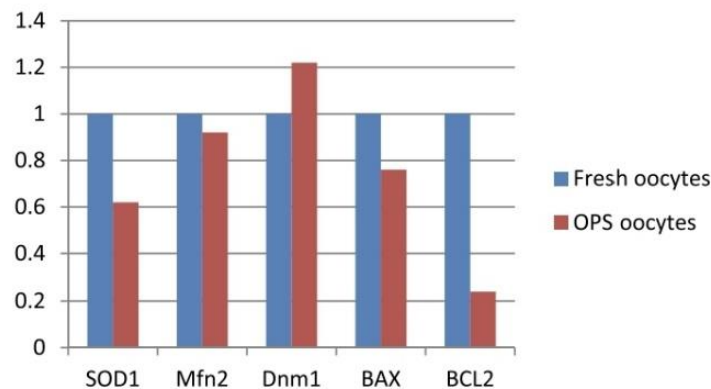


Figura 6. Efecto de la vitrificación de ovocitos de cerdo en MII sobre los niveles de expresión génica. Las barras de color azul representan los ovocitos MII frescos y las barras de color rojo los ovocitos MII desvitrificados mediante el sistema de vitrificación OPS (16).

Con la vitrificación se han conseguido altas tasas de supervivencia ovocitaria, sin embargo, esto no necesariamente significa que los ovocitos hayan conservado su competencia de desarrollo. Con el objetivo de mejorar el potencial de desarrollo de ovocitos desvitrificados, Chen et al. (12) llevaron a cabo un estudio para evaluar el efecto de la adición de resveratrol (Res) en la solución de vitrificación sobre el potencial de desarrollo de ovocitos de ratón desvitrificados desde la perspectiva de las alteraciones epigenéticas. Para poder estudiar los efectos de la adición de Res en la estabilidad de la impronta genómica, previamente mediante RTqPCR midieron los niveles de expresión de unos pocos genes sometidos a impronta en ovocitos MII desvitrificados y MII frescos. La vitrificación alteró el perfil de expresión de los genes GTL2, PEG3, PEG10, IGF2R y SIRT1 (**Tabla 2**). En concreto, disminuyó la expresión de SIRT1, corroborado también por el menor nivel de la enzima desacetilasa Sirt1 en ovocitos MII desvitrificados, tras realizar la técnica Western Blot. El Res, aparte de los beneficios por sus propiedades antioxidantes, mostró tener un papel en la corrección de algunas modificaciones epigenéticas anormales causadas por la vitrificación de ovocitos.

Los estudios comentados anteriormente proporcionan evidencias moleculares sobre cómo la vitrificación de ovocitos puede alterar el perfil de expresión génica.

En humanos la bibliografía es escasa y no se han encontrado tantas evidencias como en animales (principalmente en ratón) de que la vitrificación ovocitaria pueda afectar a la expresión génica.

Di Pietro et al. (17) compararon el transcriptoma parcial de ovocitos humanos MII desvitrificados frente al de ovocitos MII frescos. Para ello analizaron mediante RTqPCR el nivel de expresión de ocho genes que codifican para proteínas esenciales durante la maduración ovocitaria, debido a su papel en la viabilidad del gameto y en el desarrollo folicular y embrionario. De esos ocho genes, tres de ellos son de expresión constitutiva: HPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y CICLOFILINA A, codifican para proteínas implicadas en funciones celulares básicas y están presentes en todas las células del organismo humano. Los otros cinco codifican para las proteínas: Bmp15 (proteína morfogenética ósea 15), Gdf9 (factor de crecimiento / diferenciación 9) y Figla (*folliculogenesis specific basic helix-loop-helix*) son esenciales durante la foliculogénesis; Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) marcador de pluripotencia de las células madre embrionarias, el cual se expresa a niveles elevados en ovocitos maduros y es fundamental durante la embriogénesis temprana; Taf4b (*TATA-box binding protein associated factor 4b*) se expresa a niveles elevados en ovocitos maduros, siendo un importante factor regulador en la gametogénesis femenina de mamíferos. Los ovocitos MII desvitrificados no mostraron alterado su perfil de expresión génica en comparación con el de MII frescos, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (**Tabla 3**).

En otra investigación mucho más reciente llegaron a una conclusión similar, D'Aurora et al. (18) estudiaron el efecto de la vitrificación de ovocitos y la edad de la mujer sobre la expresión de genes relacionados con la citocinesis y con la segregación cromosómica en ovocitos humanos MII desvitrificados y MII frescos. Mediante RTqPCR midieron los niveles de expresión de PLK1 (*Polo-like kinase 1*) y de las subunidades de Dinactina (DCTN1, 2, 3 y 6). En los ovocitos MII desvitrificados la expresión de dichos genes no se vio alterada por la vitrificación, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (**Tabla 3**).

Tabla 3*Efecto de la vitrificación de ovocitos humanos sobre los niveles de expresión de genes*

Referencia	Materiales	Técnica empleada	Secuencia estudiada	Conclusión
Di Pietro et al. (17)	Supernumerarios: MII frescos y MII desvitrificados	RTqPCR	HPRT,GAPDH, CYCLOPHILIN, BMP15,GDF9, FIGLA, OCT4, TAF4B	Sin diferencias significativas
Chamayou et al. (19)	Supernumerarios: MII frescos y MII desvitrificados	RTqPCR	18 genes	En ovocitos MII desvitrificados se vio disminuida la expresión de todos los genes estudiados, manteniendo un 63,3% de su contenido de mRNA respecto a los MII frescos
Monzo et al. (5)	MII frescos y MII desvitrificados (aquellos que no fueron fecundados)	Micromatrices	Análisis global (Affymetrix, HGU133 Plus2.0)	En ovocitos MII desvitrificados se vio alterada la expresión de 608 genes: 99 mostraron una expresión mayor y 509 una expresión menor, en comparación con MII frescos. Especialmente genes de la vía ubiquitina-proteasoma, así como genes implicados en la poliadenilación del mRNA se vieron regulados a la baja
D'Aurora et al. (18)	Supernumerarios: MII frescos y MII desvitrificados	RTqPCR	DCTN 1, 2, 3, 6 PLK1	Sin diferencias significativas

Por otro lado, la vitrificación de ovocitos si tuvo repercusiones sobre la expresión génica (5,19). En estos estudios se analizaron un número de genes mucho mayor y no tan específicos como los analizados por Di Pietro et al. (17) o D'Aurora et al. (18).

Más concretamente, Chamayou et al. (19) estudiaron el nivel de expresión de 18 genes en ovocitos humanos MII desvitrificados y MII frescos, mediante RTqPCR. En los ovocitos MII desvitrificados la expresión de genes relacionados con la organización estructural del DNA (TOP1, NAP1L1...), con la regulación del ciclo celular (MAPK6, CLTA, CKS2) y con vías mitocondriales (ATP5GJ, SDHC) disminuyó considerablemente en comparación con la expresión de los ovocitos MII frescos. Igualmente, aunque de forma más moderada, disminuyó la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de la estructura cromosómica (STAG3/20, SMC/1A,1B...) y marcadores de pluripotencia (OCT4, DPPA3, FOXJ2). Todos estos genes resultan esenciales en la adquisición de competencia ovocitaria y desarrollo

embrionario temprano. Los ovocitos MII desvitrificados sufrieron daño molecular asociado a la disminución en su contenido de mRNA, conservando el 63,3% del contenido de mRNA en comparación con el de los ovocitos MII frescos (**Tabla 3**).

El otro estudio se realizó un año después por Monzo et al. (5), donde analizaron el perfil de expresión génica de ovocitos MII desvitrificados y MII frescos mediante micromatrices (*microarrays*), lo que permitió estudiar la expresión de un gran número de genes a la vez. En los ovocitos MII desvitrificados la expresión de 608 genes se vio alterada, de los cuales 99 mostraron una expresión mayor y 509 una expresión menor, en comparación con el perfil de expresión de los ovocitos MII frescos. Principalmente se vieron regulados a la baja genes relacionados con la proteólisis (a través del sistema ubiquitina-proteasoma) y con la poliadenilación del mRNA (genes PAPOLA y CPSF2).

8. ARGUMENTACIÓN CRÍTICA

Hoy en día, existe una creciente conciencia del impacto de las TRA sobre el desarrollo embrionario, la expresión génica, las modificaciones epigenéticas y los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad. Con los avances en la ciencia, los científicos prestan cada vez más atención al estado epigenético de los ovocitos y embriones, los cuales se ven sometidos a un drástico estrés ambiental *in vitro* durante el proceso de vitrificación y desvitrificación. La reprogramación epigenética ha sido estudiada ampliamente en ratones, sin embargo, en la especie humana este proceso se conoce poco debido a las restricciones legales y éticas, así como a las limitaciones en la calidad y cantidad de ovocitos y embriones humanos disponibles para la investigación.

Hasta la fecha, aunque los protocolos de vitrificación ovocitaria permiten obtener tasas de supervivencia relativamente altas, no significa necesariamente que hayan alcanzado la competencia de desarrollo ovocitario y embrionario necesarias. Varios estudios señalaron una tasa de división y tasa de blastocisto menor en aquellos procedentes de ovocitos MII desvitrificados, tanto en la especie bovina (10) como en ratón (11,13).

Entre las principales modificaciones epigenéticas destaca la metilación del DNA, muy pocos estudios en humanos han evaluado sus cambios. Entre ellos destaca el estudio de De Munck et al. (9) con un tamaño muestral de 14 embriones de D3 procedentes de ovocitos MII

desvitrificados. Estos embriones mostraron el mismo patrón de metilación global del DNA que los 17 embriones de D3 procedentes de MII frescos. Es un tamaño muestral excesivamente pequeño como para poder obtener una conclusión válida. Cuánto más pequeña es la muestra más imprecisión tendrán los resultados (los intervalos de confianza de los parámetros estudiados serán más amplios). De esta manera, las diferencias tendrán que ser mayores para poder alcanzar significación estadística. Corriendo el riesgo de que, aunque exista una diferencia real, no se pueda asegurar su existencia por ser la muestra demasiado pequeña, perdiendo la ocasión de demostrar diferencias que, aunque pequeñas, pueden ser relevantes.

Varios estudios con modelos animales (4,10,11,12,13) han demostrado que la vitrificación de ovocitos MII modifica el perfil global de metilación del DNA. Esta modificación epigenética es uno de los principales mecanismos implicados en la estabilidad cromosómica e integridad estructural, por lo que un nivel apropiado de metilación en el genoma global es esencial para el desarrollo embrionario temprano. Los ovocitos MII desvitrificados mostraron una reducción significativa en los niveles de 5mC (4,10,11,12) y 5hmC (4). Además, durante las primeras divisiones (desde el estadio de 2 a 8 células) aquellos embriones procedentes de ovocitos MII desvitrificados tanto en bovino como ratón mantuvieron niveles menores de 5mC (10,11), así como en blastocistos de bovino procedentes de MII desvitrificados a nivel de TE (10). En cuyo caso muy probablemente el desarrollo de la placenta se vea afectado como consecuencia de esta alteración en la impronta genómica.

De forma opuesta, a lo largo del desarrollo de embriones procedentes de ovocitos de ratón MII desvitrificados los niveles de 5 mC no se vieron afectados (13), acorde a lo descubierto en embriones humanos al menos hasta D3 de desarrollo (9). Además, estos embriones de ratón presentaron niveles menores de 5hmC (producto intermediario en la oxidación de la 5mC consecuencia de la desmetilación activa) desde el estadio de 8 células hasta blastocisto, en comparación con aquellos procedentes de MII frescos (13). Sin embargo, los niveles de 5hmC en embriones humanos a D3 procedentes de ovocitos MII desvitrificados no se vieron afectados (9). Esta discrepancia entre resultados podría explicarse por la diversidad entre especies. Los eventos de reprogramación asociados a la metilación del DNA que tienen lugar durante el desarrollo embrionario temprano en ratón no reflejan necesariamente los de otras especies como la bovina o humana, ya que el alcance y el momento de los eventos epigenéticos a lo largo del desarrollo preimplantacional son diferentes entre mamíferos (3). Por ejemplo, los embriones preimplantacionales humanos y de ratón presentan diferencias en el momento de mayor

activación genómica, estadio de 2 células en ratón y estadio de 4 a 8 células en humano; así como en el momento en el que se inicia la metilación de *novo*, siendo más temprana en ratón que en humano o bovino (3).

Además, también habría que valorar si el uso de una u otra técnica para la fecundación influye sobre el estado epigenético de los ovocitos y posteriores embriones, al ser la ICSI mucho más invasiva que la FIV.

Los niveles reducidos de metilación e hidroximetilación del DNA en ovocitos MII desvitrificados indican que estos experimentan un cambio severo en el estado epigenético después de la vitrificación y desvitrificación, que además parece mantenerse a lo largo del desarrollo embrionario temprano, pudiendo verse comprometido el potencial de desarrollo *in vitro* de embriones de ratón y bovino.

Estos cambios documentados en el patrón global de metilación del DNA en ovocitos MII desvitrificados podrían explicar los cambios de expresión génica encontrados en la literatura. O viceversa, los cambios en la expresión de ciertos genes, consecuencia de la vitrificación de ovocitos, podrían explicar la hipometilación del DNA. Apoyado por el hecho de que en varios modelos animales (4,10,13,14,15) los genes desregulados intervienen en mecanismos epigenéticos, principalmente codifican para las enzimas Dnmts, involucradas en los procesos de metilación de *novo* y mantenimiento del DNA, como para las enzimas Tets, implicadas en el proceso de desmetilación activa del DNA.

El estrés inducido por la vitrificación de ovocitos MII puede afectar a la capacidad del ovocito para sintetizar y almacenar cantidades suficientes de factores maternos, como los transcritos de genes DNMTs, los cuales resultan claves en el establecimiento y mantenimiento de la impronta genética durante el desarrollo embrionario.

La vitrificación de ovocitos conlleva la salida de agua a través de la membrana celular mediante ósmosis hacia el medio extracelular, donde la concentración es muy elevada debido a la presencia de crioprotectores no permeables (como la sacarosa). Son sustancias de alto peso molecular, caracterizadas por ejercer su acción protectora promoviendo la rápida deshidratación celular. A su vez los crioprotectores permeables (como el etilenglicol o dimetilsulfóxido) son sustancias de bajo peso molecular, que penetran en el interior celular y deshidratan la célula por sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de concentración de solutos en el medio extracelular, impidiendo la formación de cristales en el interior y evitando el estrés

osmótico. Hay que tener en cuenta que el mRNA es una molécula de cadena sencilla, las interacciones dipolo-dipolo con las moléculas de agua equilibran la base nucleotídica, la ribosa, el fosfato, así como las estructuras secundarias y terciarias. Por lo que la salida masiva de agua hacia el medio extracelular podría desplegar las moléculas de mRNA y facilitar la entrada de ribonucleasas, lo que llevaría a la hidrólisis del mRNA. Esta podría ser una de las razones por la que los ovocitos de ratón MII desvitrificados mostraron niveles de expresión de DNMTs más bajos que los ovocitos MII frescos (14, 15), que a su vez explicaría la hipometilación del DNA encontrada en ovocitos MII desvitrificados (4,10,11,12).

Además, tras la fecundación de ovocitos MII desvitrificados y en estadio de blastocisto, los niveles de expresión de DNMTs no recuperaron sus valores normales, más concretamente la expresión de DNMT3A y DNMT3B se vio regulada a la baja tanto en bovino (10) como en ratón (15), respectivamente. La reducción en la abundancia de transcritos de DNMTs conduce a la desmetilación pasiva del DNA. Lo que tendrá inevitablemente un efecto sobre la herencia epigenética, la cual depende en gran medida del mantenimiento y nuevo establecimiento de la metilación del DNA, donde el alelo reprimido es metilado y el alelo activo escapa a la metilación, en asociación con cada ciclo de replicación del DNA.

El control de la transcripción y expresión génica durante la maduración del ovocito y las primeras etapas de la embriogénesis depende de los niveles de poliadenilación de los mRNA maternos, dado que el extremo 3' del pre-mRNA recién sintetizado debe estar protegido para evitar su degradación prematura. Estos niveles de poliadenilación en humanos son regulados por la poli (A) polimerasa alfa, codificada por el gen PAPOLA, enzima clave responsable de la adición de poli(A) en el extremo 3' del pre-mRNA, y por el factor específico de escisión y poliadenilación, codificado por el gen CPSF2, el cual genera un corte en el pre-mRNA y a partir del extremo 3'OH libre comienza la adición de nucleótidos de adenina, cola de poli (A). La cual confiere mayor estabilidad a la molécula de mRNA y permite su transporte desde el núcleo hacia el citoplasma para su traducción. En ovocitos humanos MII desvitrificados los niveles de expresión de dichos genes se vieron regulados a la baja en comparación con MII frescos (5). Lo que podría explicar el menor contenido de transcritos de genes que codifican para proteínas esenciales en la adquisición de competencia ovocitaria encontrado en ovocitos humanos MII desvitrificados (19), generando una gran inestabilidad molecular.

La cuestión radica en dilucidar si ese menor porcentaje en el contenido de mRNA podría tener repercusiones en la competencia de desarrollo de ovocitos MII desvitrificados y/o en los

embriones procedentes de los mismos. Los embriones humanos procedentes de MII desvitrificados, al menos hasta el estadio de 5 células, mostraron un número de células y una cinética de desarrollo comparables a los de embriones procedentes de MII frescos (9). Por lo que en caso verse disminuido el contenido de mRNA, ese nivel de transcritos y proteínas en el ovocito parecen suficientes para mantener las funciones biológicas mínimas. Bien es cierto que en etapas tan tempranas los requerimientos del embrión son muy escasos, por lo que sería necesario alargar el periodo de estudio al menos hasta el momento de activación del genoma embrionario (estadio de 8 células), a la vez que se integran la transcriptómica y proteómica para descifrar las consecuencias metabólicas de este tipo de modificaciones.

Asimismo, la disminución en el contenido de mRNA maternos almacenados hasta la activación del genoma embrionario, puede generar un daño potencial en la maquinaria biológica que lleve a un menor potencial de desarrollo embrionario o incluso ser la respuesta al porqué los niños nacidos mediante TRA muestran una mayor frecuencia en la aparición de enfermedades raras relacionadas con la impronta genómica como el Síndrome de Beckwith–Wiedemann o de Angelman (8). Por ejemplo, en el Síndrome de Angelman el patrón de metilación característico se identifica por la ausencia del alelo metilado materno y la presencia del alelo no metilado paterno. Tal vez los niveles de expresión de DNMTs se vean reducidos en ovocitos humanos MII desvitrificados, al igual que se ha visto que ocurre en ratón (14,15), y de ahí la ausencia de metilación en el alelo materno.

En ovocitos de ratón MII desvitrificados se consiguió aumentar los niveles de 5mC y restaurar la expresión normal de ciertos genes sometidos a impronta mediante la adición de Res a la solución de vitrificación (12). Este antioxidante es un activador de la enzima desacetilasa Sirt1, la cual promueve la actividad metiltransferasa de Dnmt1. Dado los beneficios del uso de Res en la vitrificación de ovocitos se deberían proseguir los estudios en ratón para luego poder extrapolarlo a humanos, con el fin de en un futuro reducir la incidencia de enfermedades asociadas a fallos en la impronta como el Síndrome de Angelman. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los efectos de la vitrificación de ovocitos sobre la expresión y patrones epigenéticos pueden variar de una manera dependiente de la especie, así como de las regiones genómicas analizadas.

Por otra parte, también la expresión alterada de la familia de genes TETs podría explicar la pérdida de metilación del DNA asociada a la vitrificación de ovocitos. Estos genes codifican

para las principales enzimas de desmetilación activa que pueden producir la oxidación de 5mC en varios derivados de metilación, como 5hmC, 5fC y 5caC. Al igual que en ratón con los transcritos de DNMTs, los ovocitos MII desvitrificados también mostraron un menor contenido de transcritos de TET2 en comparación con MII frescos (13). Al ampliar el periodo de estudio hasta la etapa de blastocisto, en los embriones de 4-8 células procedentes de MII desvitrificados la expresión de TET1 disminuyó, mientras que la expresión de TET2 aumentó en el estadio de mórula en comparación con embriones procedentes de MII frescos (13). Por lo que muy probablemente la disminución en los niveles de 5mC (10,11) y 5hmC (13) durante las primeras etapas de desarrollo embrionario pueda explicarse por la expresión alterada de los genes TET1 y TET2.

Por el contrario, Fu et al. (4) reportaron un mayor contenido de transcritos TET2 y TET3 en ovocitos MII desvitrificados, así como un acúmulo significativo de la proteína Tet3. En este estudio (4) analizaron los ovocitos a las 2 horas desde el momento de su desvitrificación y en la publicación de Cao et al. (13) lo analizaron justo en el momento en que se desvitrificaron, por ello los resultados de estos dos estudios no son excluyentes entre sí. Podría ser que el ovocito al ser sometido a tanto estrés necesite tiempo para recuperarse y poder continuar con el proceso de transcripción y traducción iniciado previamente durante la ovogénesis. Pudiendo ser la acumulación anormal de Tet3, enzima implicada en la desmetilación activa del DNA, una de las principales razones por las que los niveles de 5mC y 5hmC se vieron reducidos en ovocitos MII justo a las 2 horas desde el momento de su desvitrificación y no antes, poniendo en evidencia esta relación causa-efecto (4).

Como futura vía de investigación sería muy interesante poder regular la expresión de las enzimas Dnmts y Tets mediante la adición al medio de vitrificación de ovocitos diferentes componentes como, por ejemplo, vitaminas. Con el fin de recuperar los patrones normales de metilación del DNA.

Hasta alcanzar la etapa de blastocisto el embrión utiliza la energía proporcionada por las mitocondrias maternas para dividirse, siendo el ovocito el motor que impulsará el desarrollo de un nuevo ser humano. Los ovocitos contienen un gran número de mitocondrias, las cuales proporcionan energía mediante la fosforilación oxidativa, donde el O₂ actúa como aceptor final de cuatro electrones, dando lugar a una molécula de agua. Cuando la reducción del O₂ es parcial se generan las especies reactivas de oxígeno (ROS). Al captar el O₂ un electrón se produce el

radical superóxido, que puede dar lugar al peróxido de hidrógeno y al radical hidroxilo, el más tóxico de todos. Tanto en ovocitos humanos MII desvitrificados (19) como en otros modelos animales como porcino (16) se vieron afectados los niveles de expresión de genes relacionados con la función mitocondrial. La expresión alterada de estos genes generó un daño mitocondrial, que se tradujo en un incremento de los niveles de ROS (16).

Las ROS tienden a captar electrones de otras moléculas que se encuentren a su alrededor, entre ellas DNA, lípidos y proteínas provocando su oxidación. Lo que generó en los ovocitos un estrés oxidativo que muy posiblemente estimuló la vía intrínseca de la apoptosis, explicando el mayor nivel de apoptosis encontrado en los ovocitos de cerdo MII desvitrificados con respecto a ovocitos MII frescos (16).

Asimismo, los ovocitos de cerdo MII desvitrificados mostraron una reducción muy significativa en el nivel de expresión del gen BCL2 y mucho más moderada para el gen BAX (16). En mamíferos la familia de proteínas Bcl-2 está implicada en el control de la apoptosis mediante el control de la permeabilidad mitocondrial y la liberación del citocromo c.

Bajo condiciones normales de supervivencia celular, el citocromo c se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial. Sin embargo, algunos estímulos como un mayor estrés oxidativo provocan la liberación del citocromo c al citosol, lo que se acompaña de la pérdida del potencial de membrana y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo c se une a Apaf-1 y una vez unido recluta y activa a la procaspasa 9, la cual puede a su vez activar otras caspasas. Las caspasas son proteasas que juegan un papel clave en el proceso de la apoptosis, una vez activas producen la hidrólisis de la proteína sustrato. Así, la activación inicial de una caspasa provoca una reacción en cadena que conduce a la activación de otras caspasas y finalmente a la muerte celular.

Algunos miembros de la familia de proteínas Bcl-2 son anti-apoptóticos como el propio Bcl-2 que se encuentra en la membrana externa de la mitocondria e inhíbe la liberación de citocromo c. Además, entre sus funciones destaca la disminución de los niveles de ROS. Otros miembros de esta familia como Bax son pro-apoptóticos y se encuentran en el citosol promoviendo la liberación del citocromo c desde la mitocondria. La expresión reducida del gen anti-apoptótico BCL2 podría explicar el mayor nivel de apoptosis encontrado en los ovocitos de cerdo MII desvitrificados, así como contribuir al aumento de ROS (16). Se podría plantear la adición de antioxidantes a la solución de vitrificación de ovocitos como mostraron Chen et al. (12) en ratón, donde el uso de Res disminuyó los niveles de ROS y la ratio de apoptosis, mejorando la calidad y el consecuente desarrollo de los ovocitos MII desvitrificados.

El mayor nivel de estrés oxidativo mencionado anteriormente en los ovocitos MII desvitrificados (16) también conduce a la oxidación de proteínas. Pueden ser oxidaciones reversibles, las cuales serán reducidas por distintos sistemas enzimáticos y, por tanto, actuar como mecanismos de regulación de la función proteica; o pueden ser irreversibles llevando a la inactivación proteica. Dado que no existen sistemas de reparación, estas proteínas oxidadas deben ser degradadas. El proteasoma es un complejo multiproteico grande y muy conservado, cuya función principal es la degradación enzimática de proteínas. Cuando este sistema de degradación no es capaz de eliminarlas de forma adecuada se acumulan en el interior celular, provocando toxicidad y finalmente la muerte celular.

La expresión de genes relacionados con la vía ubiquitina-proteasoma se vio reducida en ovocitos humanos MII desvitrificados (5). La inhibición de la maquinaria de degradación llevaría al acúmulo de proteínas oxidadas, que podría explicar el mayor nivel de apoptosis detectado en ovocitos de cerdo MII desvitrificados (16), siendo necesario verificarlo en humano.

En el polo opuesto, se encuentran los estudios en los que la vitrificación de ovocitos humanos en MII no tuvo repercusiones sobre la expresión génica (17,18). Ambos estudiaron un número de genes muy reducido y específico, que codifican para proteínas con un papel y función en el ovocito muy diferentes entre sí. El uso de nuevas tecnologías con una alta resolución analítica, permitirá analizar a gran escala el transcriptoma de los ovocitos MII desvitrificados, lo que permitirá tener una visión global de cómo afecta la vitrificación a la expresión génica. Además de replicarse en otras muestras de mayor tamaño para confirmar los resultados obtenidos.

En futuros estudios sería necesario estandarizar la forma de obtención de ovocitos. Dado el acceso limitado a obtener ovocitos humanos con fines de investigación, en el estudio de Monzo et al. (5) tanto el grupo de control como el grupo de vitrificación se obtuvieron de ovocitos en MII no fecundados, los cuales se vitrificaron pasadas 24-48 horas después de realizar la ICSI. La cual supone una fuente de estrés añadida, pudiendo tener alguna repercusión, aún desconocida, sobre el epigenoma de los ovocitos. En el resto de estudios en humano, los ovocitos en MII se vitrificaron directamente tras la punción folicular (9,17,18,19).

Asimismo, dada la gran heterogeneidad existente entre estudios, tanto en animal como en humano, un factor clave sería estandarizar un protocolo de vitrificación. El uso de diferentes

soportes de vitrificación pudo actuar como variable de confusión entre estudios. Los sistemas cerrados como el Cryotip empleado por Monzo et al. (5) o HSV utilizado por Di Pietro et al. (17) y D'Aurora et al. (18) pertenecen al grupo de “soportes en contenedor cerrado” y son los que brindan la mayor seguridad en términos de aislamiento de la muestra. En estos se utilizan soportes del tipo abiertos que son introducidos en un contenedor que es sellado antes de la inmersión en N₂ líquido. Este tipo de procedimiento puede comprometer seriamente la velocidad de enfriamiento de la muestra debido a que la capa de aire que la rodea tiene un efecto de aislante térmico. Aunque el sistema cerrado se ha utilizado con éxito en la vitrificación de blastocitos humanos, el potencial de desarrollo de los ovocitos vitrificados con este sistema es menor en comparación con el de los ovocitos que han sido vitrificados utilizando sistemas abiertos, como Cryotop. La mayor competencia de desarrollo de los ovocitos muy posiblemente se encuentre vinculada al uso de un volumen mínimo de la solución de vitrificación, aumentando la tasa de enfriamiento y calentamiento. Junto con el uso de una menor concentración de crioprotectores y por tanto una menor toxicidad para los ovocitos, contribuyendo a la mejora de su supervivencia.

La utilización de sistemas abiertos de vitrificación ofrece unas elevadas tasas de supervivencia (90-95%) y unos resultados clínicos similares a los obtenidos con ovocitos frescos (1). Sin embargo, ha entrado en juego un nuevo factor, el estatus epigenético de los ovocitos, el cual debe ser tenido en consideración a la hora de hablar de la seguridad y eficacia de la vitrificación. Ya que como se ha podido vislumbrar en la presente revisión los ovocitos son sensibles al estrés inducido por esta técnica, viéndose afectado su patrón normal de metilación del DNA como su expresión génica. Con repercusiones, por ahora en gran parte desconocidas, sobre la competencia ovocitaria y sobre el posterior desarrollo de los embriones procedentes de MII desvitrificados.

9. CONCLUSIONES

Tras la revisión del conjunto de literatura en el presente trabajo, se puede concluir lo siguiente:

1. Se sugiere que los perfiles epigenéticos y transcriptómicos de los ovocitos en MII son sensibles al estrés inducido por la vitrificación.
2. La vitrificación de ovocitos MII se asocia a hipometilación del DNA, pudiendo verse comprometido el posterior desarrollo embrionario temprano.
3. La expresión alterada de enzimas implicadas en la metilación de *novo* y mantenimiento del DNA (Dnmts), así como en la desmetilación activa (Tets), puede explicar la hipometilación del DNA encontrada en ovocitos MII desvitrificados.
4. La vitrificación afecta a la capacidad del ovocito para sintetizar y almacenar cantidades suficientes de factores maternos, claves en el mantenimiento y establecimiento de la impronta, así como en la adquisición de competencia ovocitaria.
5. El menor contenido de transcritos en ovocitos MII desvitrificados puede deberse al menor nivel de expresión de genes que intervienen en la poliadenilación del mRNA y/o a su vez, a la salida masiva de agua de la célula (asociada al proceso de vitrificación) junto con la entrada de ribonucleasas.
6. Entre los genes que se ven diferencialmente afectados en ovocitos MII desvitrificados señalar aquellos relacionados con las vías mitocondriales y con la vía ubiquitina-proteasoma. Generándose un gran estrés oxidativo, así como un acúmulo de proteínas oxidadas, que conducirá finalmente a la apoptosis celular.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Mínguez Y, García Velasco JA. Estado actual de la criopreservación. *Rev Iberoam Fert Rep Hum.* 2012; 29: 99-111
2. Camprubí C. Impronta genómica y reproducción asistida. *Rev Asoc Est Biol Rep.* 2010; 15(1):36-41
3. Petrusa L, Van De Velde H, De Rycke M. Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20(9):861-74. doi:10.1093/molehr/gau049.
4. Fu L, Chang H, Wang Z, Xie X, Chen H, Lei Z, et al. The effects of TETs on DNA methylation and hydroxymethylation of mouse oocytes after vitrification and warming. *Cryobiology.* 2019; 90:41-46. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.09.001
5. Monzo C, Haouzi D, Roman K, Assou S, Dechaud H, Hamamah S. Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Hum Reprod.* 2012; 27(7):2160-2168. doi:10.1093/humrep/des153
6. Moreno T, Henarejos I. Influencia de los genes de efecto materno y transición materno-cigótica. *Rev Asoc Est Biol Rep.* 2018; 23(2):31-37
7. Hart R, Norman RJ. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: part I-general health outcomes. *Hum Reprod.* 2013; 19(3):232-43. doi:10.1093/humupd/dms062
8. Odom LN, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(6):517-522. doi:10.1097/MED.0b013e32834040a3
9. De Munck N, Petrusa L, Verheyen G, Staessen C, Vandeskelde Y, Sterckx J, et al. Chromosomal meiotic segregation, embryonic developmental kinetics and DNA (hydroxy)methylation analysis consolidate the safety of human oocyte vitrification. *Mol Hum Reprod.* 2015; 21(6):535-544. doi: 10.1093/molehr/gav013
10. Chen H, Zhang L, Deng T, Zou P, Wang Y, Quan F, et al. Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology.* 2016; 86(3):868-878. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.008
11. Liang Y, Fu X, Li J, Yuan D, Zhu S. DNA methylation pattern in mouse oocytes and their in vitro fertilized early embryos: effect of oocyte vitrification. *Zygote.* 2014; 22(2):138-145. doi: 10.1017/S0967199412000512

12. Chen H, Zhang L, Wang Z, Chang H, Xie X, Fu L, et al. Resveratrol improved the developmental potential of oocytes after vitrification by modifying the epigenetics. *Mol Reprod Dev.* 2019; 86(7):862-870. doi: 10.1002/mrd.23161
13. Cao Z, Zhang M, Xu T, Chen Z, Tong X, Zhang D, et al. Vitrification of murine mature metaphase II oocytes perturbs DNA methylation reprogramming during preimplantation embryo development. *Cryobiology.* 2019; 87:91-98. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.01.012
14. Zhao X-M, Ph.D, Ren J, M.Sc, Du W, Ph.D, Hao H, Ph.D, Wang D, Ph.D, Qin T, Ph.D, et al. Effect of vitrification on promoter CpG island methylation patterns and expression levels of DNA methyltransferase 1 α , histone acetyltransferase 1, and deacetylase 1 in metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril.* 2013;100(1):256-261. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.03.009
15. Cheng K, Ph.D, Fu X, Ph.D, Zhang R, Ph.D, Jia G, Ph.D, Hou Y, Ph.D, Zhu S, Ph.D. Effect of oocyte vitrification on deoxyribonucleic acid methylation of H19, Peg3, and Snrpn differentially methylated regions in mouse blastocysts. *Fertil Steril.* 2014; 102(4):1183-1190.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.06.037
16. Dai J, Wu C, Muneri CW, Niu Y, Zhang S, Rui R, et al. Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. *Cryobiology.* 2015; 71(2): 291-298. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.08.002
17. Di Pietro, Cinzia, M.Sc., Ph.D, Vento, Marilena, M.Sc., Ph.D, Guglielmino MR, M.Sc, Borzì P, M.D, Santonocito M, M.Sc, Ragusa, Marco, M.Sc., Ph.D, et al. Molecular profiling of human oocytes after vitrification strongly suggests that they are biologically comparable with freshly isolated gametes. *Int J Fertil Steril.* 2010; 94(7):2804-2807. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.060.
18. D'Aurora M, Budani MC, Franchi S, Sarra A, Stuppia L, Tiboni GM, et al. Dynactin pathway-related gene expression is altered by aging, but not by vitrification. *Reprod Toxicol.* 2019; 88:48-55. doi: 10.1016/j.reprotox.2019.06.011
19. Chamayou S, Bonaventura G, Alecci C, Tibullo D, Di Raimondo F, Guglielmino A, et al. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. *Cryobiology.* 2011; 62(2):130-134. doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.01.014
20. Barberet J, Barry F, Choux C, Guilleman M, Karoui S, Simonot R, et al. What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? *Clin Epigenetics.* 2020; 12(1):121. doi:10.1186/s13148-020-00911-8