

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**



Trabajo Final de Grado

**Efecto del tiempo de cultivo sobre la viabilidad y
desarrollo de embriones de conejo**

Grado en Biotecnología

Alumna: Ana Alberola Romano

Directores:

José S. Vicente Antón

David Sánchez Peñaranda

Valencia, Julio 2018

Título del TFG:

Efecto del tiempo de cultivo sobre la viabilidad y desarrollo de embriones de conejo

Alumna: Dña. Ana Alberola Romano

Tutores Académicos: Prof. D. José Salvador Vicente Antón y Prof. D. David Sánchez Peñaranda

Valencia, Julio 2018

RESUMEN

El conejo es utilizado como modelo animal en la biología reproductiva debido a las ventajas que suponen ser una especie de ovulación inducida por el coito, de ciclo reproductivo corto, del que es posible obtener, cultivar, crioconservar o transferir embriones con éxito y que presenta, además, un desarrollo embrionario temprano similar al humano.

Si bien es cierto que a mediados del siglo XX se inició el cultivo de embriones en distintas especies, lo que ha ayudado a la caracterización, manipulación y estudio del desarrollo embrionario, desde su implementación esta técnica no ha conseguido mimetizar el ambiente oviductal y uterino de la hembra. A pesar de los avances en la composición y condiciones de cultivo, cada vez más se observa que la técnica del cultivo embrionario provoca efectos adversos sobre el embrión más allá de su viabilidad.

El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación del efecto que tiene el cultivo sobre la calidad embrionaria, empleando como indicadores, la viabilidad de los blastocistos a los 6 días y la expresión de genes fundamentales en el desarrollo embrionario: octamer-binding transcription factor (*OCT4*), *NANOG* homeobox (*NANOG*) y sex determining region Y-box 2 (*SOX2*).

Los resultados obtenidos muestran que los embriones sometidos a cultivo *in vitro* presentan una menor viabilidad *in vivo*, tras ser transferidos a hembras receptoras, en términos de tasa de blastocistos desarrollados a 6 días; obteniendo tasas del 71-75% para embriones que no han sido cultivados frente a tasas del 25% cuando el cultivo tiene una duración de 48 h. A su vez, se ha observado que la transferencia de los embriones cultivados durante 48 h presenta mayor éxito en cuanto al porcentaje de blastocistos recuperados a los 6 días o al nacimiento cuando la transferencia se realiza a una hembra asincrónica; ya que los embriones disponen de un ambiente oviductal más apropiado y acorde a las alteraciones en su patrón de desarrollo. Por otro lado, se ha demostrado que la incubación durante 48h de los embriones afecta a la calidad de los mismos en términos de expresión embrionaria de los genes de pluripotencialidad *OCT4* y *SOX2*, la cual se ve significativamente afectada por el cultivo *in vitro* de embriones recuperados al día siguiente de la inseminación.

PALABRAS CLAVE

Cultivo; coneja; embriones; blastocistos; expresión génica; desarrollo embrionario

Títol

Efecte del temps de cultiu sobre la viabilitat i el desenvolupament d'embrions de conill

RESUM

El conill és utilitzat com a model animal en la biologia reproductiva a causa dels avantatges que suposen ser una espècie d'ovulació induïda pel coit, de cicle reproductiu curt, del que és possible obtenir, cultivar, crioconservar o transferir embrions amb èxit i que presenta, a més, un desenvolupament embrionari enjorn semblant a l'humà.

Si bé és cert que a mitjan segle XX es va iniciar el cultiu d'embrions en distintes espècies, la qual cosa ha ajudat a la caracterització, manipulació i estudi del desenvolupament embrionari, des de la seua implementació aquesta tècnica no ha aconseguit mimetitzar l'ambient oviductal i uterí de la femella. A pesar dels avanços en la composició i condicions de cultiu, cada vegada més s'observa que la tècnica del cultiu embrionari provoca efectes adversos sobre l'embrió més enllà de la seua viabilitat.

L'objectiu d'aquest treball ha sigut l'avaluació de l'efecte que té el cultiu sobre la qualitat embrionària, emprant com a indicadors, la viabilitat dels blastocists als 6 dies i l'expressió de gens fonamentals en el desenvolupament embrionari: octamer-binding transcription factor (*OCT4*), NANOG homeobox (*NANOG*) i sex determining regió Y-box 2 (*SOX2*).

Els resultats obtinguts mostren que els embrions sotmesos a cultiu *in vitro* presenten una menor viabilitat *in vivo*, després de ser transferits a femelles receptores, en termes de taxa de blastocists desenvolupats a 6 dies; obtenint taxes del 71-75% per a embrions que no han sigut cultivats enfront a taxes del 25% quan el cultiu té una duració de 48 h. Al seu torn, s'ha observat que la transferència dels embrions cultivats durant 48 h presenta major èxit en quant al percentatge de blastocists recuperats als 6 dies o al naixement quan la transferència es realitza a una femella asincrònica; ja que els embrions disposen d'un ambient oviductal més apropiat i d'acord amb les alteracions en el seu patró de desenvolupament. D'altra banda, s'ha demostrat que la incubació durant 48h dels embrions afecta la qualitat dels mateixos en termes d'expressió embrionària dels gens de pluripotencialitat *OCT4* i *SOX2*, la qual es veu significativament afectada pel cultiu *in vitro* d'embrions recuperats l'endemà de la inseminació.

PARAULES CLAU

Cultiu; conilla; embrions; blastocists; expressió gènica; desenvolupament embrionari

Title

Effect of culture time on the viability and development of rabbit embryos

ABSTRACT

The rabbit is used as an animal model in reproductive biology due to the advantages of being a type of ovulation induced by intercourse, a short reproductive cycle, from which it is possible to obtain, cultivate, cryopreserve or transfer embryos successfully and which also presents an early embryonic development similar to human.

Although it is true that in the middle of the 20th century embryo culture began in different species, which has helped the characterization, manipulation and study of embryonic development, since its implementation this technique has not managed to mimic the oviductal and uterine environment of the female. Despite advances in the composition and culture conditions, it is increasingly observed that the technique of embryo culture causes adverse effects on the embryo beyond its viability.

The objective of this work has been the evaluation of the effect that culture has on the embryonic quality, using as indicators, the viability of the blastocysts at 6 days and the expression of fundamental genes in the embryonic development: octamer-binding transcription factor (*OCT4*), NANOG homeobox (*NANOG*) and sex determining region Y-box 2 (*SOX2*).

The obtained results show that the embryos submitted to *in vitro* culture have a lower viability *in vivo*, after being transferred to recipient females, in terms of blastocyst rate developed at 6 days; obtaining rates of 71-75% for embryos that have not been cultivated against rates of 25% when the culture lasts 48 hours. In turn, it has been observed that the transfer of embryos cultured for 48 h is more successful in terms of the percentage of blastocysts recovered after 6 days or at birth when the transfer is made to an asynchronous female; since the embryos have a more appropriate oviductal environment and according to the alterations in their development pattern. On the other hand, it has been demonstrated that incubation of the embryos during 48h affects their quality in terms of embryonic expression of the pluripotency genes *OCT4* and *SOX2*, which is significantly affected by the *in vitro* culture of recovered embryos by the day after the insemination.

KEY WORDS

Culture; rabbit; embryos; blastocysts; gene expression; embryo development

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de final de carrera no es solo mío, sino de las muchas personas que han estado a mi lado a lo largo de su curso. A todas ellas les doy las GRACIAS de todo corazón.

En primer lugar a Jose, por darme la oportunidad de trabajar con su equipo, enseñarme sus conocimientos, invertir su tiempo en este trabajo y sobre todo por transmitirme su ilusión por la investigación. Agradecer también a David, por enseñarme a trabajar mejor en el laboratorio, por su tiempo y su ayuda en todo lo que podía.

A toda la gente del laboratorio; Paco, Carmen, Luis, y Ximo, por su disponibilidad y por acogerme tan bien. Especialmente, gracias a Amparo, por su enorme paciencia, su tiempo y por acompañarme en todo momento; y a Linda, mi nueva amiga italiana, por transmitirme su pasión por los animales, ayudarme en todo lo que podía y por encontrarnos en el camino.

A María, por lo afortunada que me he sentido al compartir esta etapa contigo. Gracias por hacer que el tiempo de trabajo pasase más deprisa, por todas las risas, las canciones, las coreografías, las frases hechas y las tardes de gimnasio para despejarnos. Has conseguido que me sintiese como en casa. Tremendo combo el que formamos.

Al resto de las biotecnólogas que se han convertido en mi familia durante estos cuatro años. Begoña, gracias por abrirme la mente, por su dulzura y por hacer que todo parezca más sencillo. Gema, no va a ser nada fácil superar las anécdotas que hemos pasado juntas, gracias por todas y cada una de ellas. Paula, por su bondad, por dar todo lo que tiene y más, hace falta más gente como tú en el mundo. Sara, es difícil encontrar una persona con la que cuadrar en todo, y tú has superado mis expectativas. Suzanne, el mayor descubrimiento de la carrera, gracias por tu espontaneidad y por darme tranquilidad en los peores momentos.

A mis amigos, a todos los que siempre estáis disponibles para tomar algo y despejarnos, porque aunque parezca poco para mí vale oro. En especial, a Ana, mi mitad desde que tengo memoria, mil gracias por complementarme, por ser A² siempre y la mejor amiga que podría tener. A Carola y Fátima, tanta gente ahí fuera y coincidir aquel día, gracias por escucharme siempre y convertirnos en mi familia. El equipo de tres que formamos es el mejor que he tenido en mi vida. Y a Nacho, mi amigo del alma y ejemplar único en la especie, gracias por ser tan sincero y enseñarme que hay cosas que son para siempre. Os quiero a todos.

Por último, le quiero dar las gracias a mi familia; mis padres, hermanos y demás familiares, por todo el cariño y el apoyo que me han dado no solo en este tramo final, sino a lo

largo de todo el grado. A mi tía Eli, por cuidarme tan bien estos cuatro años fuera de casa, por sus consejos y su interés en mi futuro. A mis hermanos, por animarme cuando dudaba de mí misma y ser quienes mejor saben hacerme reír. Sois los mejores del mundo. Papá y mamá, sin vuestro apoyo no habría llegado hasta aquí. Gracias por darme las mejores oportunidades, los mejores consejos y los mejores abrazos. Os lo debo todo y os quiero muchísimo.

ÍNDICE

| | | |
|---------|--|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 | El conejo como modelo animal | 1 |
| 1.2 | Fisiología reproductiva de la hembra | 1 |
| 1.2.1 | Características generales..... | 1 |
| 1.2.2 | Ciclo sexual | 2 |
| 1.2.3 | Fecundación y desarrollo embrionario temprano | 3 |
| 1.3 | Control hormonal de la respuesta ovárica..... | 4 |
| 1.3.1. | Inducción de la ovulación..... | 4 |
| 1.3.2 | Tratamientos de superovulación | 5 |
| 1.4 | Cultivo embrionario | 6 |
| 1.4.1 | Medios y métodos de cultivo | 8 |
| 1.4.2 | Efecto de la composición y las condiciones de cultivo en el desarrollo, viabilidad y calidad de los embriones..... | 9 |
| 1.4.2.1 | Condiciones ambientales | 10 |
| 1.4.2.2 | Composición del medio..... | 11 |
| 1.4.2.3 | Periodo y renovación | 13 |
| 2. | OBJETIVOS | 14 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| 3.1 | Diseño experimental | 15 |
| 3.2 | Animales..... | 16 |
| 3.3 | Recuperación de embriones | 17 |
| 3.3.1 | Superovulación y sincronización de donantes | 17 |
| 3.3.2 | Inseminación artificial | 17 |
| 3.3.3 | Recuperación de embriones de conejo de 24 h..... | 18 |
| 3.4 | Cultivo <i>in vitro</i> de embriones | 19 |
| 3.5 | Transferencia de embriones y recuperación de blastocistos..... | 19 |
| 3.6 | Evaluación de la expresión génica..... | 21 |
| 3.6.1 | Extracción del ARN y retrotranscripción | 21 |
| 3.6.2 | Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR)..... | 22 |
| 3.7 | Análisis estadístico | 23 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 24 |
| 4.1 | Efectos del cultivo sobre el porcentaje de embriones que se desarrollan <i>in vivo</i> 6 días.. | 24 |
| 4.2 | Efectos del cultivo sobre la expresión génica de los blastocistos de 6 días..... | 27 |

| | |
|-----------------------|----|
| 5. CONCLUSIONES | 31 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 32 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de comunicación hormonal tras el estímulo coital en conejo.

Figura 2. Esquema de los estadios de gastrulación de 0-7 en conejo.

Figura 3. Comparación del desarrollo de los blastocistos de 6 días. **A.** Embrión de 6 días *in vivo*. **B.** Embrión de 5 días *in vivo* + 1 día *in vitro*. **C.** Embrión de 4 días *in vivo* + 2 días *in vitro*. **D.** Embrión de 3 días *in vivo* + 3 días *in vitro*.

Figura 4. Abundancia relativa de la expresión del ARNm de *OCT4*, *VEGF* y *erbB3* en distintos grupos de estudio (Saenz de Juano et al., 2011).

Figura 5. Diseño experimental.

Figura 6. Conejo de origen Neozelandés Blanco.

Figura 7. Vagina artificial utilizada para la recuperación del eyaculado.

Figura 8. Embriones recuperados a las 22-24 h p.c. Se observan tanto embriones en estado pronuclear como en estado de 2 células.

Figura 9. Colocación de la coneja en posición decúbito supino para la laparoscopia. En el centro se observan el trócar intraabdominal, endoscopio y cámara digital. En la región inguinal se observan la aguja epidural y el catéter que contiene los embriones.

Figura 10. Tasa de blastocistos recuperados a 6 días.

Figura 11. **A.** Embriones de 24 h *in vivo* + 48 h *in vitro* en estadio de mórula temprana. **B.** Embrión en estadio de mórula compacta (72 h *in vivo*).

Figura 12. Tasa de supervivencia expresada como el porcentaje de embriones nacidos respecto a los transferidos.

Figura 13. Resumen de los niveles de expresión génica diferencial obtenidos para los embriones procedentes de los distintos tratamientos.

Figura 14. Imágenes obtenidas mediante microscopio óptico a un aumento de 20x. **A.** Embriones de 4 días desarrollados *in vivo*. **B.** Embriones de 5 días desarrollados *in vivo*. **C.** Embrión de 6 días desarrollado *in vivo*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Programa de tiempos y temperaturas empleado en la qPCR

Tabla 2. Características de los cebadores empleados en la PCR a tiempo real

Tabla 3. Efecto del cultivo sobre la tasa de recuperación de blastocistos de 6 días.

Tabla 4. Efecto del cultivo sobre la tasa de supervivencia.

Tabla 5. Análisis de los resultados de cuantificación relativa de la expresión génica.

ABREVIATURAS

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ART: técnicas de reproducción asistida

BSA: albúmina sérica bovina

CIV: cultivo in vitro

CTP: corifolitropina

eCG: gonadotropina coriónica equina

hCG: gonadotropina coriónica humana

FBS: suero fetal bovino

FCS: suero de ternera fetal

FIV/IVF: fecundación in vitro

FSH: hormona folículo estimulante

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

IA: inseminación artificial

ICM: inner cell mass

IVC: compartimentación in vitro

IVM: maduración in vitro

I.U.: unidades internacionales

KSOM: K simplex optimised medium

LH: hormona luteinizante

h.p.c.: horas post coito

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PVA: alcohol polivinílico

SOF: fluido oviductal sintético

T.R.: tasa de recuperación

T.S.: tasa de supervivencia

WEC: cultivo de embriones completos

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El conejo como modelo animal

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) es el tercer mamífero más utilizado como animal experimental dentro de la UE tras el ratón (*Mus musculus*) y la rata (*Rattus rattus*).

El conejo es un modelo animal en la investigación de enfermedades como las oftalmológicas, problemas renales crónicos, arterioesclerosis, o en pruebas toxicológicas de productos químicos que puedan provocar irritación dérmica aguda; pero fundamentalmente en biología reproductiva (capacitación espermática, maduración ovocitaria, fecundación y cultivo y desarrollo temprano (Brousseau y Hoeg, 1999; Fischer *et al.*, 2012)).

Uno de los motivos principales de su uso es el hecho de que el conejo es una especie de ciclo reproductivo corto con una gestación de 31 días y cuya ovulación es inducida por el coito, lo que conlleva una mayor precisión a la hora de establecer la edad y el momento de desarrollo del embrión o feto. Como consecuencia se dispone de un amplio conocimiento morfológico y molecular sobre el desarrollo embrionario temprano y los procesos de gastrulación, implantación y placentación, destacando el hecho de que el desarrollo temprano ocurre de manera similar al de la especie humana (Fischer *et al.*, 2012). Además, este animal se caracteriza por el bajo coste y fácil crianza y mantenimiento (Stübinger y Dard, 2013). Por otro lado, los embriones de conejo pueden ser objeto de experimentación *in vitro* ya que pueden ser obtenidos, cultivados, crioconservados o modificados con éxito (Bank y Maurer, 1974; Halacheva *et al.*, 2011).

1.2 Fisiología reproductiva de la hembra

1.2.1 Características generales

Las conejas son mamíferos placentarios capaces de reproducirse a partir de los 4 meses de edad aproximadamente. No obstante, no se recomienda aparearlos a esa edad, sino según la raza o estirpe entre los 4,5 y 6 meses, ya que todavía no han alcanzado la suficiente madurez y podría afectar a su desarrollo (Rodríguez, 1999).

El aparato reproductor de la hembra se caracteriza por disponer de dos cuernos uterinos y cérvix independientes, lo que evita que los embriones migren de un útero a otro, suponiendo una gran ventaja en el diseño de experimentos de transferencia de embriones, ya que es posible introducir por separado dos grupos de embriones en la misma coneja (Foote *et al.*, 2000).

Por otra parte, la coloración que la vulva adquiere es un buen indicador del desarrollo folicular y consecuentemente de la concentración de estrógenos en la sangre, lo que coinciden con una mayor o menor eficacia del apareamiento. En general, un rojo intenso coincide con el periodo de máxima aceptación al macho; y el violeta en cambio indica la etapa que sigue a este momento, cuando la hembra es menos receptiva (Colombo *et al.*, 2017).

En el conejo, como ovulador inducido que es, tienen lugar oleadas en las que los folículos se desarrollan y experimentan atresia continuamente sin ovular. En esta especie, la ovulación tiene lugar entre 10 y 12 horas después del estímulo coital (Foote *et al.*, 2000). Otro aspecto destacable en la fisiología reproductiva de la hembra del conejo, es que si la inducción de la ovulación no es debida a una monta o inseminación fértil, ésta inicia una pseudogestación similar a la fase luteal de otras especies. En estos casos, se observa la formación de cuerpos lúteos en los ovarios que al cabo de 15-16 días desde la ovulación son reabsorbidos e inicia un nuevo periodo de celo (Fischer *et al.*, 1986).

Teniendo en cuenta estas características, el éxito de la obtención de embriones de un estadio determinado o el seguimiento del desarrollo fetal queda determinado con relativa facilidad, siendo el momento más idóneo cuando la vulva presenta un rojo intenso, periodo en que de llevar a cabo la monta o la inducción con análogos de gonadotropinas, la ovulación se producirá en más del 95% de los casos. Siendo estas conejas, las que disponen de las secreciones y ambientes uterino y oviductales idóneos para que tengan lugar los procesos de capacitación espermática, fecundación y desarrollo embrionario.

1.2.2 Ciclo sexual

Como se ha mencionado anteriormente, la coneja se diferencia de otras especies en que no presenta un ciclo estral con la ovulación, por lo que no se producen patrones hormonales cíclicos (Foote *et al.*, 2000).

La liberación de hormonas implicadas en el comportamiento reproductivo del conejo, al igual que otras especies, se producen en el eje hipófisis-hipotálamo-gónadas (Hafez, 1984). Las principales hormonas involucradas son la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). El estímulo que desencadena la secreción hormonal es la monta, momento en el cual la coneja desencadena la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) desde el hipotálamo. Estas hormonas actúan como un segundo estímulo sobre la hipófisis, la cual secreta FSH y LH, que actuarán a nivel ovárico. Una de las funciones de la FSH es la liberación de estrógenos de los folículos al torrente sanguíneo, que conlleva una coloración rojiza de la vulva y un cierto grado de turgencia de la misma, lo que indica un alto nivel de receptividad (Cortell, 2012). Ambas hormonas inducen las etapas finales de la maduración del ovocito a la metafase II, justo antes de la ovulación (Fig. 1).

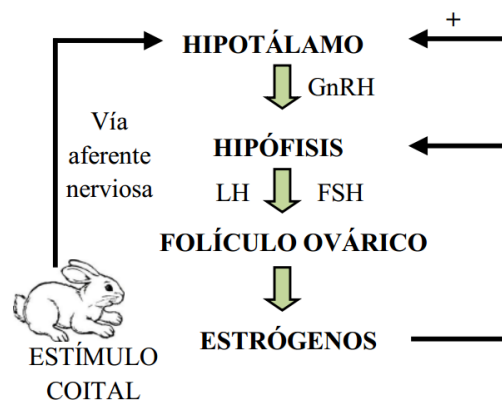


Figura 1. Mecanismo de comunicación hormonal tras el estímulo coital en conejo.

1.2.3 Fecundación y desarrollo embrionario temprano

La ovulación tiene lugar 8-10 horas post-coito (h.p.c.) y la fecundación se produce en el ámpula unas 2 horas después (10-12 h.p.c.). Aproximadamente 4 h después, el segundo corpúsculo polar es visible. Los blastómeros se dividen cada 7-8 h hasta alcanzar el estadio de 16 células entorno a las 36-40 h.p.c. A continuación, el embrión pasa al estado de mórula (~60 h.p.c.), donde el número de células es mayor que 32. A las 68 h.p.c. ocurre la compactación, estableciéndose las primeras uniones celulares. Seguidamente, tiene lugar un cambio importante, la formación del blastocisto (72 h.p.c.); en el que se puede observar la aparición del blastocele, y la diferenciación del embrioblastema y el trofoblastema (Fischer *et al.*, 2012).

A las 72 h.p.c., en torno al 90% de los embriones se encuentran en el oviducto, mientras que en el cuarto día, los blastocistos pueden ser observados u obtenidos en el útero (Fischer *et al.*, 1998), donde continuará el desarrollo embrionario hasta el momento del parto.

El diámetro de los blastocistos en el día 4 p.c. es de 1 mm aproximadamente (0,6 a 1,1 mm), llegando a alcanzar un diámetro de 2-6 mm hasta antes de la implantación en torno a los 6 días y 18 h.p.c. (Denker, 1977).

La gastrulación empieza en el sexto día p.c., etapa fundamental en la diferenciación del blastocisto y en la ontogénesis de todo vertebrado. Consta de varias etapas en las que tiene lugar la formación de los ejes del cuerpo y la generación de las capas germinales que darán lugar al embrión; mesodermo, endodermo y ectodermo.

Por ahora, se han podido identificar siete etapas durante el proceso de gastrulación (Fig. 2), mediante el uso de métodos morfológicos, moleculares (Viebahn *et al.*, 1995, 2002; Schafer-Haas y Viebahn, 2000; Viebahn, 2004) y teniendo en cuenta el sistema de clasificación desarrollado por Hamburger y Hamilton (1992) para pollo como plantilla para facilitar la comparación interespecífica intra-amniota.

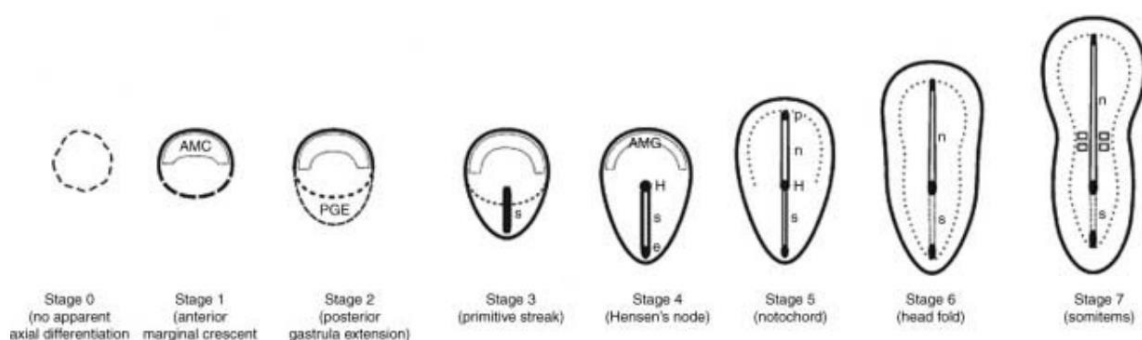


Figura 2. Esquema de los estadios de gastrulación de 0-7 en conejo.

Poco antes de la implantación (132 h.p.c.), el trofoblasto polar que cubre el disco embrionario se descama, exponiendo las células embrionarias al epitelio luminal uterino (Williams y Biggers, 1990). En la implantación el embrión se adhiere y penetra en el epitelio uterino, estableciendo la posición definitiva que ocupará durante la gestación, gracias a la ausencia de contracciones provocada por el aumento de la progesterona (Cortell, 2012).

Tras implantarse, el embrión establece contacto físico con el endometrio, el cual sufrirá cambios hasta formar una cámara de implantación para acomodar al embrión en desarrollo. A su vez se produce un aumento de la vascularización uterina, que conlleva tanto la formación de nuevos vasos sanguíneos como el aumento de grosor de los ya existentes. Todos los sistemas de órganos principales aparecen poco después de que el embrión se haya implantado en la pared uterina y mientras aún tiene pocos milímetros de longitud (New, 1978).

El diálogo embrio-materno en conejos se desarrolla a través de las placentas, materna y fetal. Por un lado, los cambios que sufre el endometrio en respuesta a la implantación dan lugar a la formación de la decidua (placenta materna), donde subyacerá el embrión durante el embarazo. La placentación corioalantoidea (placenta fetal) ocurre en el día 8 p.c. (Denker, 1977).

La placenta del conejo se desarrolla como una placenta discoide y hemocorial, como en el caso del ser humano y los roedores (Duval 1889). Al igual que ocurre en primates, el crecimiento de la placenta es más rápido en la primera mitad del embarazo, mientras que el peso fetal aumenta durante la segunda mitad como consecuencia de un gran incremento de los intercambios feto-maternal (McArdle *et al.*, 2009).

Debido a la similitud del desarrollo embrionario y feto-placentario en los primeros 10-11 días entre humanos y conejos, este animal constituye un buen modelo para observar los efectos de distintos estudios en feto y placenta.

1.3 Control hormonal de la respuesta ovárica

1.3.1. Inducción de la ovulación

Como se ha explicado, el estímulo natural neuroendocrino que induce la secreción de GnRH para desencadenar la ovulación a las 8-10 horas es la monta, siendo necesaria en el caso de la inseminación artificial (IA) la administración de análogos de la GnRH a las hembras para inducir así la ovulación (Cortell, 2012). La posibilidad de inducir la ovulación en el momento deseado mediante la administración de hCG, LH o un análogo de GnRH supone una gran ayuda en la planificación de los estudios.

Las técnicas de inducción de la ovulación han estado disponibles desde hace muchos años, permitiendo obtener de manera fiable una gran cantidad de ovocitos o embriones (Kennelly, 1965; Daniel, 1971). Generalmente, se puede conseguir la ovulación en casi todos los animales inyectando por vía intramuscular de 10 a 25 U.I. de hCG, 20 de gonadorelina (GnRH natural) o 0,8 a 1 µg de acetato de buserelina o deslorelina (análogos sintéticos de GnRH).

Por otro lado, las hembras sometidas a tratamientos de superovulación reciben una dosis para inducir la ovulación mayor para garantizar que la mayor parte de folículos desarrollados ovulen (1,5 mg/Kg de LH, 50-75 I.U. de hCG o 2 µg de acetato de buserelina) (Foote y Simkin, 1993; Kennelly y Foote, 1965; Joly, 1997; García-Ximénez y Vicente, 1992; Viudes-de-Castro *et al.*, 1995; Vicente *et al.*, 2003). Las inyecciones de LH o hCG pueden

realizarse vía intravenosa para proporcionar una oleada rápida de gonadotropina (Foote *et al.*, 2000).

1.3.2 Tratamientos de superovulación

La fertilidad y prolificidad de los conejos es alta (entre 8-15 embriones por hembra, dependiendo de la raza o línea), aunque se puede aumentar mediante tratamientos hormonales con el fin de reducir el número de conejos donantes en la experimentación (Fischer *et al.*, 1988).

Las técnicas de superovulación consisten en la estimulación de los ovarios de la hembra mediante la administración de hormonas exógenas, para de este modo aumentar el número de óvulos, y por tanto de embriones, obtenidos por ciclo (Cortell, 2012). Estos tratamientos superovulatorios llevados a cabo en conejo se aplican de forma análoga en reproducción asistida humana, ya que en conjunto con la técnica de la IA consigue aumentar la eficiencia reproductiva.

Debido a la validez del conejo como modelo en biología reproductiva, la conveniencia de obtener grandes cantidades de óvulos de conejo para estudios fisiológicos ha llevado a investigar la utilidad de varios componentes gonadotrópicos para este fin (Pincus, 1940). Cuando se aplica el tratamiento con gonadotropinas, los procedimientos con los conejos de laboratorio son más predecibles, y los experimentos se pueden realizar con éxito independientemente de la época del año (Fischer, 1988).

Los conejos responden bien a la superovulación, al igual que los ratones y ratas, cuya superovulación está bien establecida (Foote *et al.*, 2000). Sin embargo, son varios los factores que afectan el resultado de la sobreestimulación ovárica, como la preparación y dosificación de gonadotropinas, el modo de administración, las características del donante, el medio ambiente, etc. (Driancourt, 2001; Palmer *et al.*, 2005) Así mismo, es necesario tener en cuenta que la administración de estos tratamientos puede resultar en una disminución de la calidad de los ovocitos y embriones (Cortell, 2012).

La gran mayoría de tratamientos para la inducción de la superovulación se basan en la utilización de las hormonas FSH y la gonadotropina coriónica equina (eCG). Específicamente, en conejos, para asegurar el número máximo de embriones recuperados por donante, tanto la eCG (20-25 U.I./kg) como la FSH (0,75 mg/kg) derivada de la glándula pituitaria ovina y porcina se han usado comúnmente para inducir la superovulación (Hashimoto *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2005; Joly *et al.*, 1996; Viudes *et al.*, 2017). No obstante, el coste y los protocolos de aplicación han favorecido la utilización de eCG aunque sus resultados en términos de respuesta y calidad parecen inferiores a los obtenidos con FSH de origen hipofisario animal. La respuesta, en cualquier caso, es variable, entre 20 y 50 óvulos o embriones por coneja.

Recientemente, la FSH de origen animal está siendo sustituida por FSH recombinante y se están introduciendo modificaciones en su estructura para obtener un periodo de biodisponibilidad mayor, lo que simplifica los protocolos. Se ha observado que una única inyección de corifolitropina alfa (CTP, gonadotropina similar a la FSH pero modificada por una glicosilación) muestra una acción prolongada que puede usarse eficazmente en conejos para provocar un aumento de más de cuatro veces la tasa de ovulación en comparación con los

animales control (Viudes *et al.*, 2017). En algunas conejas (5%) llegan a producir en torno a 100 embriones con este nuevo agente hormonal.

No obstante, el desarrollo *in vitro* de los blastocistos, la tasa de implantación y la tasa de viabilidad al nacer se ven significativamente afectados por el tratamiento de superovulación, tanto con CTP como con FSH a pesar de que el patrón de expresión de ARN mensajero (ARNm) de *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* en embriones de tres días no varía significativamente en los grupos sometidos a tratamientos de superestimulación respecto de los controles (Viudes *et al.*, 2017).

1.4 Cultivo embrionario

A mediados del siglo XX se llevaron a cabo distintas investigaciones de la mano de Whitten, McLaren, Biggers y Brinster entre otros; con la intención de examinar el desarrollo de embriones de ratón *in vitro* y evaluar el éxito de este. Parámetros como la tasa de desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocisto, y la tasa de embriones nacidos tras realizar transferencias a madres receptoras, fueron evaluados utilizando medios de cultivo con distinta composición y partiendo de embriones en diferentes estadios (Whitten *et al.*, 1968). Hasta 1949 prácticamente todos los estudios de cultivo embrionario de mamífero se llevaron a cabo en conejo (Biggers, 1987).

En los primeros estudios realizados en ratón, se sugirió la necesidad del co-cultivo de los embriones con tejido procedente de la trompa de Falopio, sobre todo en el periodo intermitótico entre la primera y segunda división de los cigotos, para que estos se pudiesen desarrollar a blastocistos (Whittingham *et al.*, 1967). Sin embargo, se describió un medio simple químicamente en el cual los cigotos de ratones pueden desarrollarse desde el estadio de 1 célula hasta la etapa de blastocisto completamente *in vitro* (Whitten *et al.*, 1968). Se trata de una modificación de la solución de bicarbonato de Krebs-Ringer, donde destacan la incorporación del lactato para soportar la primera división, una concentración cuatro veces mayor de albúmina cristalina de plasma bovino que en otros medios y una menor osmolaridad debido a la reducción de cloruro sódico (Biggers *et al.*, 1968). Estudios realizados en conejo (Lewis y Gregory, 1929; Pincus, 1930), concluyeron que los embriones de este animal requerían medios más complejos que en el caso de ratones dado que no se consiguió que los embriones de desarrollaran hasta el estadio de blastocisto. Fue en 1968 cuando Onuma *et al.*, informaron que los embriones de 2 a 8 células podían desarrollarse hasta la etapa de blastocisto en expansión cuando se cultivaban en suero de conejo o bovino; y 1 año después Maurer *et al.* Demostró que los embriones de 1 célula también podían llegar a blastocisto en suero bovino (Biggers, 1987).

El estudio de medios de cultivo para el desarrollo de estas dos especies, conejo y ratón, sirvieron como modelo para el cultivo de embriones de otras especies. De este modo, en 1975 se pudieron cultivar embriones de conejo, oveja, hurón y de algunas cepas genéticas de ratón; desde la etapa de una sola célula hasta el estadio de blastocisto. No obstante, los avances en humanos, vacas, cerdos, ratas y hámsteres no fueron en paralelo, y únicamente se consiguió el cultivo de embriones para un menor rango de tiempo (Biggers, 1987).

La técnica del cultivo de material biológico presenta un gran abanico de utilidades en distintos ámbitos de la experimentación. Por ejemplo, la manera más frecuente para realizar una valoración de embriones sometidos a distintas técnicas o factores es el cultivo *in vitro* de los mismos, debido a la simplicidad de la técnica y a la información que aporta. En esta valoración, se consideran viables los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto expandido en el tiempo adecuado (Lonergan *et al.*, 2003) o se catalogan como más viables aquellos que responden a una cronología concreta de desarrollo, permitiendo la sincronización del embrión con el tracto femenino y de este modo mayores tasas de implantación (Gardner y Lane, 1997).

Atendiendo a los objetivos, el cultivo embrionario no solo debe incrementar la eficiencia reproductiva, aumentando la tasa de producción de embriones *in vitro* (número de ovocitos que se desarrollan en blastocistos), sino que deben ser de la mayor calidad posible para de este modo conseguir tasas de gestación óptimas tras realizar una transferencia (Lonergan *et al.*, 2003).

Son varios los criterios en base a los cuales se puede clasificar el cultivo de embriones, siendo uno de ellos la edad del embrión. El cultivo de embriones se puede iniciar en diferentes estadios (Hohn *et al.*, 1992), por lo que se habla tanto de cultivo de embriones pre-implantación como post-implantación; teniendo en cuenta que la implantación en conejos ocurre en el séptimo día tras la ovulación. Por una parte, el cultivo de embriones de conejo preimplantacional es un procedimiento de rutina para estudiar los mecanismos del desarrollo normal y anormal, que se ha practicado durante muchos años. Las ventajas del cultivo de embriones preimplantacionales incluyen la capacidad de desarrollar embriones en diferentes medios definidos y condiciones, y la capacidad de transferir embriones cultivados a receptoras para determinar sus efectos sobre la viabilidad (Foote *et al.*, 2000).

En cuanto al cultivo de embriones postimplantacionales, comúnmente denominado cultivo de embriones completos (WEC), permite, entre otros, el estudio de mecanismos de teratogénesis en ratas y ratones. El cultivo postimplantacional de embriones en conejo, cuyo desarrollo transcurre de forma similar en rata, ha tenido un éxito limitado, pero la técnica ha mejorado mucho recientemente en esta especie (Foote *et al.*, 2000).

El periodo embrionario posterior a la implantación abarca desde el día 7 de gestación, momento en que finaliza la implantación, hasta el día 20 de gestación aproximadamente, cuando termina el proceso de organogénesis. En esta etapa, los embriones se han podido cultivar hasta 48 horas manteniendo un desarrollo similar al que tiene lugar *in vivo*, experimentando durante este periodo un desarrollo extenso del corazón, la región craneofacial, el cerebro (incluidos sistemas óptico, ótico y olfativo), la columna vertebral y las extremidades (Foote *et al.*, 2000).

En varios trabajos se ha conseguido que el cultivo *in vitro* de blastocistos de 6 días en medios comerciales definidos suplementados con suero de coneja permita el desarrollo *in vitro* de los embriones hasta alcanzar el nivel 7 de gastrulación tras 48-72 horas de cultivo; permitiendo la caracterización del desarrollo del trofoblasto y de la gástrula. También se ha visto que a las 48 h de cultivo, el porcentaje de blastocistos inviables es mayor en grupos de

embriones vitrificados debido a una mayor tasa de colapso celular que en los grupos control (Vicente *et al.*, 2015).

1.4.1 Medios y métodos de cultivo

Con el auge de la técnica de fecundación *in vitro* en las clínicas, existe la necesidad de maximizar la viabilidad embrionaria, por lo que se realiza un escrutinio sobre los medios utilizados para mantener al embrión *in vitro*. Existen varios medios disponibles para el cultivo de embriones *in vitro*, desde soluciones salinas simples como el fluido oviductal sintético (SOF), hasta medios de cultivo más complejos como el TCM-199 o Ham's F10 (Lane y Gardner, 2007).

Las investigaciones sobre los medios de cultivo han permitido obtener grandes mejoras, disponiendo actualmente de medios simplificados como el KSOM, que contiene únicamente alcohol polivinílico (PVA) como macromolécula, que promueve casi el 100% de desarrollo de cigotos y embriones de 2 células en blastocistos (Foote *et al.*, 2000).

Otra de las variaciones que puede haber en el cultivo embrionario es el sistema de cultivo, atendiendo a la frecuencia de renovación del medio. Se distinguen: el cultivo en un paso utilizando un único medio (*nonrenewal monoculture*); el cultivo con renovación de un único medio al segundo o tercer día (*renewal monoculture*); y el cultivo en dos pasos, en el cual se utilizan dos medios con distinta composición (*sequential media culture*). Este último se ha valorado como el mejor protocolo durante los últimos años, sin embargo, existen dudas sobre si este método es mejor que los de paso único (Elder *et al.*, 2011).

A la hora de escoger el método de cultivo cabe destacar que la automatización es muy importante y necesaria en los laboratorios de técnicas de reproducción asistida (ART), no solo si se deben registrar múltiples parámetros de caracterización en diferentes momentos del desarrollo embrionario, sino también para evitar decisiones subjetivas con respecto a la transferencia y selección de embriones. Por lo tanto, idealmente, el cultivo y la caracterización de embriones deberían combinarse en una plataforma única y automatizada, como la tecnología microfluídica (Le Gac y Nordhoff, 2016).

El uso de sistemas microfluídicos permite optimizar los procesos *in vitro* (IVF, IVC, IVM), ya que se controla con mayor precisión el entorno local que rodea a un único embrión, además de permitir tomas muestras del fluido de forma local para estudiar distintos aspectos como la producción de proteínas, etc. (Beebe *et al.*, 2002).

En el cultivo de microfluidos, una primera categoría de dispositivos consiste en matrices de micropocillos donde los embriones se aíslan individualmente en micropocillos independientes, pero se comunican entre sí a través de un exceso de medio de cultivo (algunos microlitros) cubierto con aceite mineral (Han *et al.*, 2010). Otros sistemas híbridos combinan estructuras a mesoescala y microescala usando gotas del tamaño de microlitros, donde se han podido cultivar embriones preimplantacionales acoplados a una red de microfluidos para proporcionar un medio de crecimiento fresco (Heo *et al.*, 2010). Finalmente, se han desarrollado varios dispositivos completamente microfluídicos en los que los embriones se cultivan en microcanales (Hickman *et al.*, 2002; Raty *et al.*, 2004) o microcámaras (Melin *et al.*, 2009; Kieslinger *et al.*, 2015).

Aunque la tecnología de microfluidos ya existe hace un par de décadas, todavía no ha llegado a las clínicas y laboratorios de FIV, debido entre otros a la falta de facilidad de uso y la automatización de las plataformas de microfluidos, así como a la ausencia de una validación sólida y convincente con embriones humanos (Le Gac y Nordhoff, 2016). A pesar de estas limitaciones, los microfluidos proporcionarán un cambio notable en la forma en que se realiza la embriología y la reproducción asistida (Beebe *et al.*, 2002).

1.4.2 Efecto de la composición y las condiciones de cultivo en el desarrollo, viabilidad y calidad de los embriones

Existen múltiples evidencias de que la calidad de los blastocistos desarrollados *in vitro* es menor que aquellos producidos *in vivo*, encontrándose diferencias a nivel ultraestructural, génico y metabólico (Lonergan *et al.*, 2003). En la Figura 3, se observa la diferencia de tamaños de varios embriones de conejo de 6 días obtenidos *in vivo* o alternando un periodo *in vivo* y otro *in vitro*. Pese a que la edad de los embriones es la misma, el tamaño que presentan los embriones sometidos 3 días al cultivo *in vitro* es notablemente inferior al de los embriones que no han pasado por el cultivo. De la imagen se deduce que el crecimiento de los embriones es mayor conforme aumenta el periodo de tiempo en que estos permanecen en el tracto reproductor de la hembra, así como que el cultivo de los embriones provoca cierto retraso en el crecimiento de los mismos.

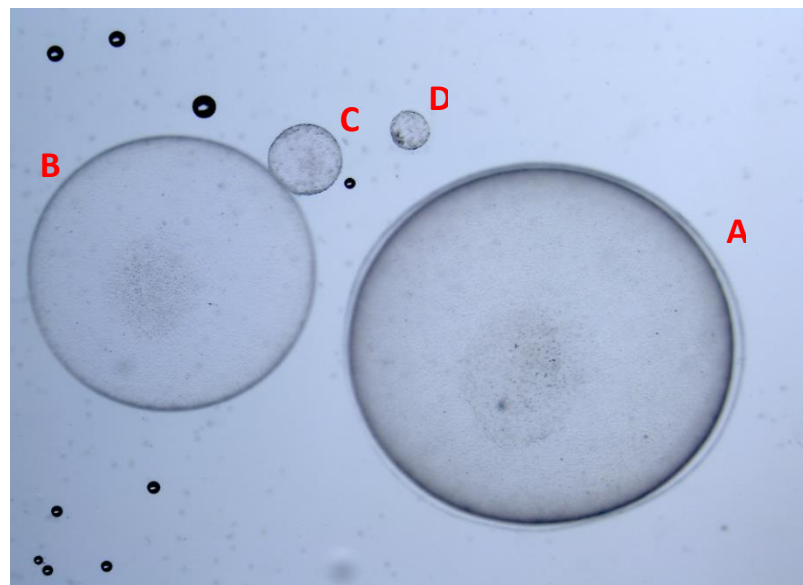


Figura 3. Comparación del desarrollo de los blastocistos de 6 días. **A.** Embrión de 6 días un vivo. **B.** Embrión de 5 días *in vivo* + 1 día *in vitro*. **C.** Embrión de 4 días *in vivo* + 2 días *in vitro*. **D.** Embrión de 3 días *in vivo* + 3 días *in vitro*.

Es importante tener en cuenta la viabilidad de estos blastocistos a parte de su calidad, ya que existen estudios realizados en humano donde las tasas de desarrollo de blastocistos eran del 40%; sin embargo, cuando los embriones eran transferidos las tasas de implantación y de nacidos vivos se reducían hasta un 7% (Bolton *et al.*, 1991). El retraso en el desarrollo de embriones *in vitro* y el descenso de la viabilidad, atienden a causas como el estrés causado por el explante o las carencias nutricionales de los medios de cultivo, los cuales no pueden imitar el papel nutricional del cambiante ambiente uterino (Hohn *et al.*, 1992).

A parte del efecto de las condiciones durante el cultivo de embriones, el potencial desarrollo del embrión está determinado por la calidad intrínseca del ovocito. En 1973 se indicó que al menos hasta la etapa temprana del blastocisto (día 3,5-4), el desarrollo está regulado de forma endógena por el embrión, y no por señales exógenas de origen materno (Van Blerkom *et al.*, 1973). Sin embargo, en varios estudios se observan ventajas en el cultivo de embriones preimplantacionales cuando se agregan secreciones uterinas. Como ejemplo, se obtienen mejores resultados cuando se produce el co-cultivo de los blastocistos con fragmentos endometriales sincrónicos precultivados (Hohn *et al.*, 1992).

Además, se ha demostrado en el estudio del cultivo de embriones bovinos que el periodo de cultivo inmediatamente después de la fecundación es el más crítico sobre la calidad del blastocisto (Lonergan *et al.*, 2003). Por tanto, las mejoras en la calidad de los blastocistos producidos *in vitro* probablemente deriven de la modificación de la composición y condiciones de cultivo tras la fecundación (Rizos *et al.* 2003).

1.4.2.1 Condiciones ambientales

Actualmente numerosos estudios demuestran que el ambiente de cultivo de embriones después de la fecundación puede tener un efecto en el patrón de expresión génica en el embrión, que a su vez puede tener serias implicaciones en el desarrollo posterior del blastocisto. Se han observado diferencias no solo cuando se comparan sistemas de cultivo *in vitro* e *in vivo*, sino también entre diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (Lonergan *et al.*, 2003).

La temperatura y el nivel de oxígeno son dos de las condiciones ambientales que determinan el éxito en el cultivo de embriones. Es de gran importancia garantizar que estos parámetros se mantengan constantes para minimizar las variaciones de ambos respecto a sus puntos óptimos.

Desde 1960, se han llevado a cabo estudios sobre el efecto de la temperatura en el cultivo de embriones de mamíferos y se ha podido comprobar en conejo, cuya temperatura corporal normal es de 38 °C, que el cultivo de embriones de 1 célula sometidos a una temperatura de 40 °C durante 6 horas da como resultado un aumento de la mortalidad embrionaria posterior a la implantación, cuando los embriones se transfieren a hembras pseudopreñadas sincrónicas. Esta mayor mortalidad no se ha observado cuando la temperatura a la que se exponen los embriones en cultivo es de 38 °C (Alliston *et al.*, 1965).

Cuando la temperatura sobrepasa los 37 °C por un par de grados se observan cambios en la expresión génica del embrión. En un trabajo llevado a cabo en vacas lecheras se observó que el embrión respondía al calor modificando la expresión de genes de respuesta al estrés que se asocian con la pérdida de la capacidad del desarrollo (Hansen, 2007).

En el caso contrario, una disminución en la temperatura de cultivo afecta tanto a los óvulos como a los embriones. Las consecuencias son varias, entre ellas la reducción de la tasa de fertilización, el retraso en el desarrollo embrionario y la disminución de la tasa de embarazo clínico (Wang *et al.*, 2001 y 2002).

Por lo tanto, hasta la fecha, los datos apuntan a que el mantenimiento de gametos y embriones en 37°C es aconsejable y efectivo (Wale y Gardner, 2015).

El nivel de oxígeno presente en el aire es del 20%, valor que difiere de la concentración de oxígeno dentro del oviducto y del útero de diferentes especies de mamífero, encontrándose ésta entre un 2-8% (Pool, 2005).

Los primeros estudios sobre la concentración de oxígeno durante el cultivo embrionario llevados a cabo en ratones informaron de que tanto valores inferiores como superiores a un 5% de oxígeno podían dañar la membrana superficial de los embriones, y por tanto detener su desarrollo. Por consiguiente, se adoptó como estándar en el cultivo de embriones la siguiente mezcla de gases: 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ (Whitten, 1969 y 1971).

A nivel de transcriptoma, se ha podido ver que el oxígeno está implicado en ciertos eventos durante el periodo preimplantacional. Por ello, al analizar la expresión génica en blastocistos de ratón sometidos a cultivo con 20% de oxígeno, se observaron 19 genes regulados positivamente y 12 negativamente al compararlos con el grupo cultivado a 5% de oxígeno (Gardner y Lane, 2005).

En cuanto a la viabilidad *in vivo*, se ha informado en humano de un aumento general en la tasa de nacidos vivos cuando se transfieren embriones cultivados con poco oxígeno. En diversos estudios la tasa de nacidos vivos aumentó un 10% cuando los embriones fueron cultivados a 5% de oxígeno en lugar de a 20% (Walenström *et al.*, 2009; Meintjes *et al.*, 2009).

En esta línea de investigación, se ha podido demostrar que una concentración de oxígeno reducida, entre 5-7%, optimiza el desarrollo embrionario preimplantacional en distintas especies de mamíferos, entre ellas la vaca, oveja, y el ratón (Thompson *et al.*, 1990; Gardner y Lane, 1996).

1.4.2.2 Composición del medio

Se han realizado estudios sobre la calidad embrionaria en bovino para determinar la influencia del SOF suplementado con FCS y/o BSA en el cultivo de blastocistos, en comparación con blastocistos *in vivo*. La presencia de suero en el cultivo dio como resultado un aumento significativo en el nivel de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, apoptosis, diferenciación e implantación. Por el contrario, el nivel de expresión de genes relacionados con comunicación a través de unión de gap y con el reconocimiento materno del embarazo disminuyó en presencia de suero. En conclusión, las condiciones del cultivo, concretamente la presencia de suero en el medio, puede afectar tanto a la velocidad de desarrollo del embrión como a la calidad de los blastocistos resultantes (Rizos *et al.*, 2003).

Así pues, también se ha observado en bovino y vacuno que el suero y otros componentes del medio de cultivo producen un incremento en el peso del feto al nacer (Behboodi *et al.*, 1995; Farin *et al.*, 2001). El cultivo provoca lo que se conoce como '*síndrome de descendencia grande*', cuyo principal síntoma es el gran tamaño de los fetos al nacer así como un crecimiento excesivo a partir del día 21 de gestación; y es similar al síndrome de Beckwith-Wiedemann en humanos (Young *et al.*, 1996; Lavara *et al.*, 2014).

La característica más llamativa del síndrome es su gran tamaño al nacer, aunque se ha detectado crecimiento excesivo del feto ya en el día 21 de la gestación ovina.

Con el fin de determinar los efectos de los distintos medios y métodos de cultivo en conejo, en 2011 se estudió el desarrollo de zigotos *in vitro* hasta blastocistos utilizando dos medios comerciales diferentes (TCM-199 y Ham's F10) y dos sistemas de cultivo diferentes (medio único de renovación y no renovación). Se identificaron diferencias significativas en el desarrollo hasta el estado de blastocisto eclosionado entre los embriones cultivados y los embriones desarrollados *in vivo*. No obstante, no hubo diferencias significativas entre los grupos con distintos medios y distintos sistemas de cultivo (Saenz de Juano *et al.*, 2011).

En este estudio, se evaluó la expresión de ARNm de distintos genes entre blastocistos cultivados durante 5 días en distintos medios y con distintos protocolos, así como de embriones de 4 y 6 días desarrollados *in vivo* (Fig. 4). Los resultados mostraron que tanto el tipo de sistema de cultivo como la elección del medio afectaron en la expresión de los genes seleccionados. La expresión global de ARNm de *OCT4* fue mayor en embriones cultivados *in vitro* que en blastocistos *in vivo*, reduciéndose la diferencia en los casos en que se produjo la renovación del medio. Para todos los genes, la mayor abundancia de transcritos se observó en medio TCM-199 no renovable. (Saenz de Juano *et al.*, 2011).

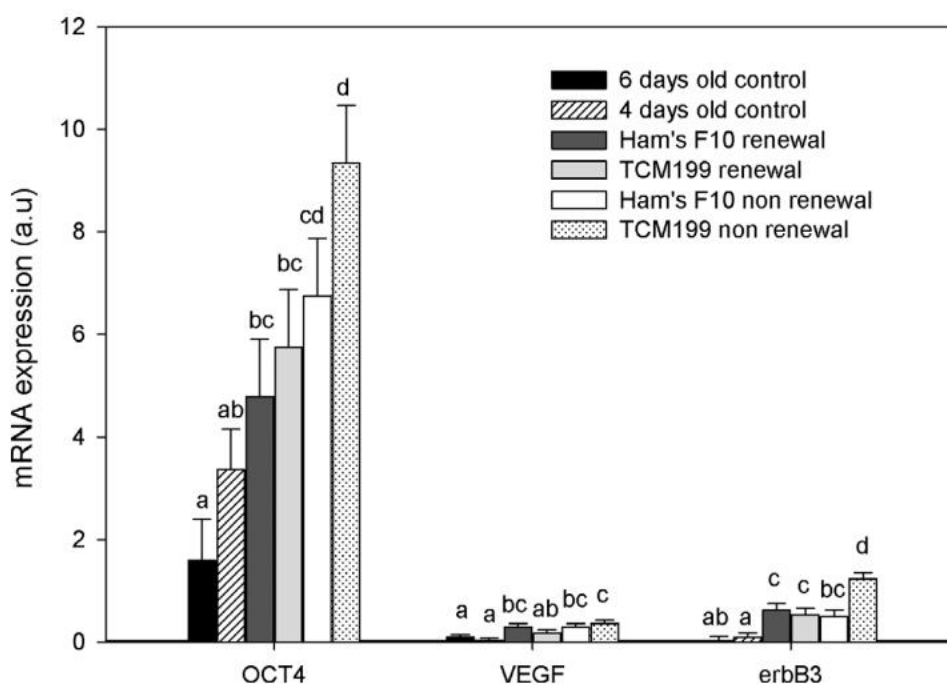


Figura 4. Abundancia relativa de la expresión del ARNm de *OCT4*, *VEGF* y *erbB3* en distintos grupos de estudio (Saenz de Juano *et al.*, 2011).

El estudio concluyó que se requerían más estudios para reducir las limitaciones actuales el cultivo a largo plazo de embriones preimplantacionales de conejo (Saenz de Juano *et al.*, 2011).

1.4.2.3 Periodo y renovación

Como se detalla en el apartado 1.4.1, existen 3 técnicas principales de cultivo atendiendo a la frecuencia de renovación y al tipo de medio empleado en el cultivo de embriones: monocultivo sin renovación, monocultivo con renovación y cultivo secuencial.

En la década de 1990 se llevaron a cabo experimentos en los que cultivaron embriones de 30 h de oveja en SOF suplementado con suero durante 2 días, seguido del cultivo durante 3 días más en el mismo medio u otro alternativo. Los resultados mostraron que el desarrollo embrionario se vio afectado significativamente por el medio empleado durante los últimos 3 días (Negrin *et al.*, 1997).

Recientemente, el método mejor evaluado ha sido el cultivo en medios secuenciales, los cuales están formulados para adaptarse a los requisitos cambiantes del embrión en desarrollo, lo que reduce el estrés celular y limita la necesidad de adaptación al cultivo por parte del embrión para crecer hasta la etapa de blastocisto. Estos sistemas permiten obtener altas tasas de embarazo tras la transferencia de los blastocistos cultivados (Lane y Gardner, 2007).

Los sistemas de monocultivo no tienen en cuenta los cambios en la fisiología del embrión durante el periodo de cultivo, por consiguiente se ha determinado que el desarrollo de los blastocistos de distintas especies es más lento cuando se emplean sistemas de monocultivo en comparación con los medios secuenciales (Gardner y Lane, 2003).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es el siguiente:

- Determinar qué efecto tiene el cultivo de 24 y 48h sobre la calidad embrionaria, empleando como indicadores, la viabilidad de los embriones a la edad de 6 días (blastocistos) y al nacimiento, además de la expresión de genes fundamentales para el desarrollo embrionario: octamer-binding transcription factor (*OCT4*), NANOG homeobox (*NANOG*) y sex determining region Y-box 2 (*SOX2*), en blastocistos de 6 días.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

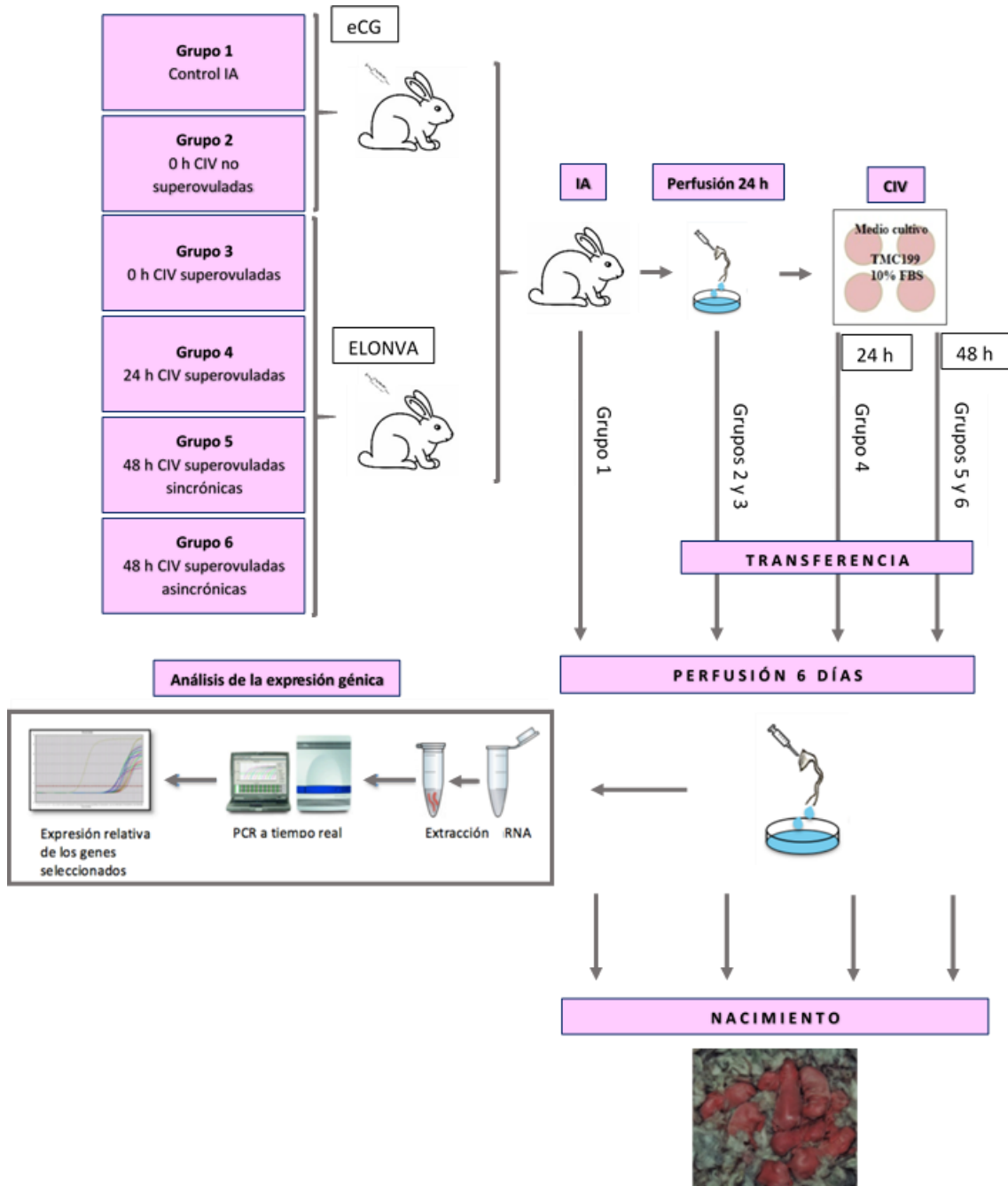


Figura 5. Diseño experimental.

El diseño experimental empleado en el estudio se muestra de manera esquemática en la Figura 5. Se establecieron 6 grupos, de los cuales 4 fueron superovulados con corifolitropina alfa y los otros 2 no se sometieron a tratamientos de superestimulación ovárica, en uno de ellos las conejas fueron inseminadas y sus embriones recuperados el día 6 post-inseminación y utilizados como grupo control (embrión no superovulado y no transferido). Para asegurar la

receptividad de las hembras donantes no superovuladas y de las conejas receptoras de embriones, éstas fueron sincronizadas con 2-3 U.I./kg de eCG (10-12 U.I. por coneja).

Cada semana, 2-3 conejas asignadas a cada grupo recibieron el tratamiento de superovulación o sincronización correspondiente a cada grupo experimental. A las 72 h de recibir el tratamiento, fueron inseminadas (IA) y tras 24 h se recuperaron los embriones mediante la perfusión de los oviductos; excepto en el caso del grupo control. Los embriones recuperados se transfirieron a las receptoras o bien se cultivaron en medio y condiciones definidas durante 24-48 h para luego ser transferidos.

Una parte de las conejas inseminadas y receptoras de embriones fueron sacrificadas a los 6 días de la inducción de la ovulación, se recuperaron los embriones en etapa de blastocisto por perfusión de los cuernos uterinos y se llevó a cabo la extracción del ARN total de los embriones. Se retrotranscribió y finalmente, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) para valorar la expresión relativa de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*. El resto de las conejas inseminadas y transferidas no se sacrificaron y se anotó el número de nacidos en el momento del parto.

3.2 Animales

Los animales utilizados como donantes y receptores de embriones fueron proporcionados por la granja cunícula del Grupo de Mejora Genética Animal del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia. Para los distintos ensayos de experimentación efectuados se han utilizado; por una parte, 46 hembras donantes de embriones adultas de una línea maternal de origen Neozelandés Blanco (Fig. 6) y por otra parte, 56 hembras adultas de la misma línea maternal, 8 inseminadas y 48 como receptoras, a las que se les transferían los embriones de los grupos experimentales. Las donantes fueron fecundadas por inseminación artificial con una mezcla de eyaculados procedentes de, al menos, 3 machos fértiles de la misma línea con edades comprendidas entre 8 y 12 meses.



Figura 6. Conejo de origen Neozelandés Blanco.

Los conejos fueron alojados en jaulas individuales bajo condiciones ambientales controladas: temperatura media diaria mínima de 17,5°C y máxima de 25,5°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y acceso libre a pienso comercial y agua filtrada. Todos

los conejos fueron manejados de acuerdo con los procedimientos aprobados por la *Generalitat Valenciana* para la instalación cunícola nº de registro 250V091 y atendiendo a la legislación sobre experimentación animal del Real Decreto 53/2013 (BOE, 2013).

3.3 Recuperación de embriones

3.3.1 Superovulación y sincronización de donantes

Todas las hembras pertenecientes a los grupos de superovulación fueron sometidas a un tratamiento con la hormona recombinante FSH de larga duración, Corifolitropina alfa (FSH-CTP; Elonva; 150 µg/mL, Merck Sharp & Dohme S.A.; Spain), en una única dosis de 3 µg/0,5mL vía subcutánea.

En el caso de las hembras pertenecientes a grupos donde no se requiere superovulación, se aseguró la receptividad mediante el tratamiento de sincronización con eCG (10-12 U.I. vía intramuscular por coneja) y observando en el momento de la inseminación la coloración de la vulva. Las manifestaciones externas que reflejan la receptividad incluyen; un aumento de la turgencia y la coloración de los labios vulvares. A mayor intensidad de coloración, mayor receptividad de la hembra, considerándose una hembra receptiva el caso en el que los labios vulvares turgentes tengan un color rojo intenso debido a la mayor irrigación sanguínea (Viudes de Castro, 2008).

3.3.2 Inseminación artificial

Todas las hembras fueron inseminadas 72 horas después de recibir el tratamiento de superovulación o sincronización. La IA se llevó a cabo mediante 0,5 mL de una mezcla de tres eyaculados de tres machos de la misma línea no emparentados. La muestra seminal se diluyó en Tris-cítrico-glucosa (0,25 M Tris (hidroximetil) aminometano, 83 mM ácido cítrico, 47 mM Glucosa) para analizar su estado.

La recuperación del semen se llevó a cabo mediante vaginas artificiales (Fig. 7), siguiendo el método descrito por Vicente *et al.* (2011). La motilidad fue examinada a temperatura ambiente tras una dilución 1:5 en Tris-cítrico-glucosa. Las observaciones se realizaron mediante un microscopio óptico de contraste de fases a 400x. En cada una de las 4 sesiones se utilizaron tres eyaculados para constituir la mezcla heteroespérmica, con una motilidad espermática superior al 70% y un porcentaje de espermatozoides anormales inferior al 25% (requerimiento mínimo empleado comúnmente en inseminación artificial, Marco *et al.*, 2010).

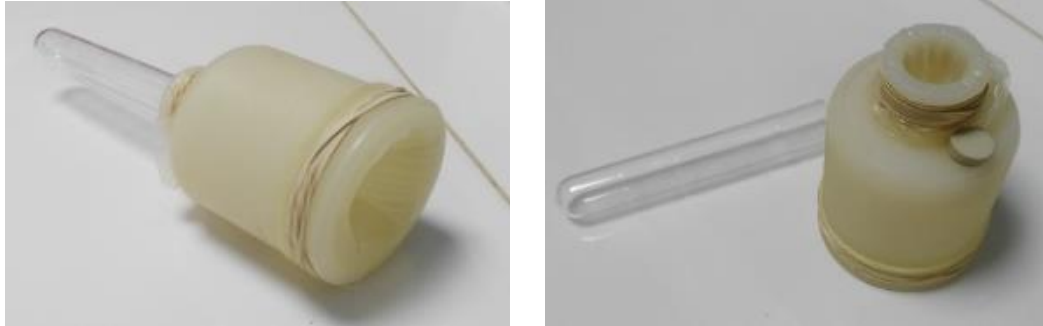


Figura 7. Vagina artificial utilizada para la recuperación del eyaculado.

Inmediatamente tras la inseminación, se indujo la ovulación mediante 1 µg de acetato de buserelina (análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH).

3.3.3 Recuperación de embriones de conejo de 24 h

Las conejas fueron sacrificadas a las 22-24 horas de ser inseminadas mediante la administración intravenosa de 1 mL/kg de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Vétoquinol, Madrid, Spain). Una vez sacrificadas, se les extirpó el aparato reproductor para proceder a la recuperación de los embriones.

Los oviductos y los cuernos uterinos fueron perfundidos con 10 mL de tampón fosfato de Dulbecco (DPBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 0,2% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,132 g/L de CaCl₂, 0,1 g/L MgCl₂ y antibióticos (100 UI de penicilina G sódica y 25 µg de dihidroestreptomina por mL; Penivet, Divisa Farmavic, Barcelona, España), y atemperado a 37°C. A través del infundíbulo se introducen los 10 mL de medio, siendo el primer mililitro introducido más despacio para dilatar la unión istmo-ampular. Debajo del cuerno uterino se coloca una placa Petri donde se recogerán los embriones para su posterior evaluación.

Los embriones se recuperaron observando las características que se corresponden con el estadio habitual de pronúcleo y 2 células a las 22-24 h tras la inseminación. Los embriones fueron catalogados como normales cuando se observó la presencia de 2 células o la presencia de 2 pronúcleos con la expulsión del 2º corpúsculo polar, en ambos casos debían tener un citoplasma homogéneo y una zona pelúcida esférica (Fig. 8). Distribuyendo, a continuación, los embriones entre los grupos 2 a 6.

Se valoró la tasa de ovulación mediante el conteo de los folículos con cicatrices de ovulación.



Figura 8. Embriones recuperados a las 22-24 h p.c. Se observan tanto embriones en estado pronuclear como en estado de 2 células.

3. 4 Cultivo *in vitro* de embriones

Se preparó una placa Nunc con 500 μ L de medio de cultivo TCM199 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con antibióticos (penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI y sulfato de dihidroestreptomicina 1250 mg/L, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España) y con un 10% de suero fetal bovino (FBS). Se colocaron alrededor de 15 embriones recuperados en cada pocillo.

Los embriones se cultivaron *in vitro* (CIV) durante 24 y 48 horas en una estufa a una temperatura de 38°C y una atmósfera controlada con un 5,0% de CO₂. Tras el cultivo los embriones fueron transferidos.

3. 5 Transferencia de embriones y recuperación de blastocistos

Se realizaron 48 transferencias de embriones en las que se transfirieron un total de 836 embriones procedentes de hembras adultas, siendo 263 de ellos transferidos inmediatamente después de la recuperación y los 573 restantes habiendo pasado por CIV.

Teniendo en cuenta la procedencia y el estado de los embriones, se realizaron transferencias a todos los grupos experimentales excepto el control:

- Grupo 2: 9 hembras receptoras de un total de 106 embriones recuperados el mismo día de hembras no superovuladas.
- Grupo 3: 10 hembras receptoras de 157 embriones recuperados el mismo día de hembras superovuladas.
- Grupo 4: 9 hembras receptoras de 144 embriones cultivados durante 24 horas procedentes de hembras superovuladas.
- Grupo 5: 9 hembras receptoras de 231 embriones cultivados durante 48 horas procedentes de hembras superovuladas.
- Grupo 6: 11 hembras receptoras asincrónicas (-24h) de 198 embriones cultivados durante 48 horas procedentes de hembras superovuladas.

Cuatro de las transferencias realizadas en cada uno de los grupos, 20 en total, se realizaron con el objetivo de evaluar la tasa de supervivencia de los embriones en el momento del parto, mientras que el resto de transferencias se realizaron para evaluar la viabilidad de los blastocistos a los 6 días.

Previo a la transferencia, las hembras receptoras fueron inducidas a ovular con 1 µg de acetato de buserelina (Hoechst, Marion Roussel, Madrid, Spain) vía intramuscular, al mismo tiempo que se realizó la IA de las donantes, para conseguir receptoras sincrónicas. Las hembras del grupo 5 fueron sincronizadas a las 24 h de realizar la IA, consiguiendo una asincronía de 1 día con la edad del embrión. Las hembras fueron anestesiadas mediante una inyección intramuscular con 16 mg de xilacina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Germany). Tras cinco minutos, las conejas reciben por vía intravenosa (vena marginal de la oreja) 16-20 mg de ketamina hidroclicídrica (Imalgène, Merial S.A., Lyon, France).

La transferencia de embriones en el oviducto fue realizada mediante laparoscopia (Besenfelder y Brem, 1993). Anestesiada la hembra, se colocó sobre una mesa de operaciones cabeza abajo y en un ángulo de 45º (Fig. 9). El lugar de la operación, la región abdominal a unos 5-6 centímetros del esternón, se peló, lavó con agua jabonosa y se desinfectó con una solución de yodo; al igual que las zonas inguinales. Mediante una cánula Verres insertada en la pared abdominal, se inyectó CO₂ para insuflar la cavidad facilitando el acceso del trócar y cánula del endoscopio. Bajo la observación laparoscópica se insertó a través de la región inguinal una aguja epidural cerca de los ovarios. Retirado el fiador de la aguja se introdujo el catéter que contenía los embriones a transferir en uno de los oviductos, éstos fueron depositados en la zona ampular del oviducto. El procedimiento se repitió en el otro lado de la hembra para transferir los embriones al otro oviducto.



Figura 9. Colocación de la coneja en posición decúbito supino para la laparoscopia. En el centro se observan el trocar intraabdominal, endoscopio y cámara digital. En la región inguinal se observan la aguja epidural y el catéter que contiene los embriones.

El número de embriones transferidos por receptora varió entre 12 y 25 según el grupo experimental y el momento de su evaluación (6 días o nacimiento).

Tras la intervención, las heridas causadas en el abdomen se desinfectaron con la solución de yodo Betadine® (Media Pharma S.A., Suecia) y se rociaron con Nobecutan (Laboratorios INIBSA, Barcelona, España) un spray coloidal que protege las zonas vulneradas. Además se le administró 200 mg Bencilpenicilina procaína y 250 mg de dihidroestreptomina sulfato (1 mL de Duphaphen Strep, Pfizer SL, Madrid, España), para evitar complicaciones posteriores derivadas de la cirugía.

La recuperación de los blastocistos se realiza por perfusión de cada cuerno uterino con 10 mL de DPBS suplementado con BSA (medio análogo al descrito para la recuperación de embriones de 1 día).

Las conejas inseminadas del grupo control que parieron fueron laparoscopizadas el día 10 post inducción de la ovulación de modo similar al procedimiento descrito anteriormente para el recuento de cuerpos lúteos en sus ovarios.

3. 6 Evaluación de la expresión génica

Para establecer si la superovulación afecta a la calidad embrionaria, se evaluaron los niveles de expresión de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* en los embriones de cada grupo experimental. La elección de estos genes se debe a su implicación tanto en el mantenimiento de la pluripotencia de las células embrionarias (Medvedev *et al.*, 2008; Shi y Jin, 2010) como en el correcto desarrollo embrionario preimplantacional (Nichols *et al.*, 1998). Los pasos seguidos para la evaluación de la expresión génica se describen a continuación.

3.6.1 Extracción del ARN y retrotranscripción

A la hora de extraer el ARN de los embriones, el reducido número de células que los componen durante los primeros estadios del desarrollo puede suponer una dificultad. Por ello, la extracción y purificación se realizó a partir de grupos de 4-7 embriones en estado de blastocisto en el caso de los grupos experimentales 1, 2, 3 y 4. Los embriones de los grupos experimentales 5 y 6 se agruparon en conjuntos de 10-16 blastocistos debido a su menor tamaño para proceder a la extracción del ARN. Se realizaron 6-8 réplicas biológicas por cada grupo experimental, excepto en el grupo 6, donde solo se pudieron realizar 4 réplicas debido a la menor viabilidad de los blastocistos.

El ARN total fue aislado utilizando el método tradicional de extracción de separación de fases con TRIzol/cloroformo. La concentración, calidad e integridad fueron evaluadas mediante el uso del equipo espectrofotométrico Nanodrop 200 (Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos).

Tras esto se llevó a cabo la transcripción reversa utilizando el kit Reverse Transcriptase Quantitect (Qiagen Iberia SL, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.2 Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR)

La cuantificación relativa de los genes objeto de este estudio se realizó mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa a tiempo Real (RT qPCR) con el termociclador modelo 7500 de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la enzima SYBR® Green como sistema de detección.

Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos con un volumen final por reacción de 20 µL. En cada reacción se utilizaron 10 µL de la solución SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), que contiene todo lo necesario para llevar a cabo la reacción: la enzima AmpliTaq Gold®, el marcador SYBR® Green y los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs). También se añadieron 3 µL de agua y 1 µL de cada uno de los primers específicos a 5 µM. Finalmente, se completaron los 20 µL añadiendo 5 µL de ADN complementario (ADNc) diluido (1:20). El programa de temperaturas empleado fue el descrito en la Tabla 1.

La normalización de la expresión se realizó mediante el uso de dos genes *housekeeping* y de un calibrador para ajustar las variaciones de ensayo a ensayo. La expresión relativa de una mezcla de ADNc de todas las muestras fue utilizada como calibrador. Además, al finalizar la PCR a tiempo real se realizó una curva de disociación del producto amplificado para descartar la presencia de amplificaciones no específicas, contaminaciones o dímeros de primer.

Tabla 1. Programa de tiempos y temperaturas empleado en la qPCR.

| | Proceso PCR | Tiempo | Temperatura |
|-----------|--|--------|-------------|
| 40 ciclos | Activación de la polimerasa HotStarTaq® | 15 min | 95°C |
| | Desnaturalización | 30 s | 95°C |
| | Alineamiento | 30 s | 60°C |
| | Extensión | 30 s | 72°C |
| | Hibridación de las cadenas | 10 min | 72°C |

Para cada uno de los genes estudiados se utilizaron cebadores específicos. Los *primers* para *OCT4* y *SOX2* se encontraron en la bibliografía (Mamo *et al.*, 2008 y Wang *et al.*, 2007, respectivamente), mientras que el *primer* para *NANOG* se puso previamente a punto en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universitat Politècnica de València. Como genes de referencia se emplearon el gen de la histona (*H2AFZ*) (Mamo *et al.*, 2008) y el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) (Navarrete-Santos *et al.*, 2008) (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los cebadores empleados en la PCR a tiempo real.

| Gen | Secuencias de los primers | Nº de acceso | Tamaño amplificado | Referencia bibliográfica |
|-------|---------------------------------|------------------------|--------------------|-------------------------------|
| H2AFZ | Fw- 5' AGAGCCGGCTGCCAGTTCC | AF030235 | 85 pb | Mamo et al., 2008 |
| | Rv- 5' CAGTCGCGCCACACGTCC | | | |
| GADPH | Fw- 5' GCCGCTTCTTCTCGTGACG | L23961 | 144 pb | Navarrete-Santos et al., 2004 |
| | Rv- 5' ATGGATCATTGATGGCGACAACAT | | | |
| OCT4 | Fw- 5' CGAGTGAGAGGCAACTTGG | NM_0010999 57 | 125 pb | Mamo et al., 2008 |
| | Rv- 5' CGGTTACAGAACCACACACG | | | |
| SOX2 | Fw- 5' AGCATGATGCAGGAGCAG | NM_003106 | 270 pb | Wang et al., 2007 |
| | Rv- 5' GGAGTGGGAGGAAGAGGT | | | |
| NANOG | Fw- 5' CCAGGTGCCTCTTACAGACA | ENSOCUT 00000013777 | 104 pb | |
| | Rv- 5' TCACTACTCTGGGACTGGGA | | | |

La cuantificación de los niveles relativos de expresión génica, técnica mediante la cual se obtiene la magnitud de los cambios en los niveles de expresión del gen de interés al compararla con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004), se realizó mediante la siguiente ecuación, descrita previamente por Weltzien *et al.*, (2005) (Ecuación 1).

$$\text{Ratio } N = E_{f_{\text{target}}}^{(Ct \text{ calibrador} - Ct \text{ muestra})} \cdot E_{f_{\text{Housekeeping}}}^{(Ct \text{ muestra} - Ct \text{ calibrador})}$$

Ecuación 1.

3. 7 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002). Para todos los análisis se consideraron como significativos los valores cuyos *p-value* son menores que 0,05 (intervalo de confianza del 95%).

Se utilizó un test de la *chi-cuadrado* con corrección de *Yate's* para evaluar las diferencias en los porcentajes de blastocistos recuperados a los 6 días y de nacidos respecto a embriones transferidos entre los grupos experimentales (Control IA, 0h CIV no superovuladas, 0h CIV superovuladas, 24 h CIV superovuladas, 48 h CIV superovuladas asincrónicas y 48 h CIV superovuladas sincrónicas). En el caso de las conejas inseminadas, se estimó el número de embriones como el número de cuerpos lúteos presentes en sus ovarios.

Para estudiar el efecto del periodo de cultivo sobre la expresión génica de *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*, se comprobó, en primer lugar, que se ajustaran a una distribución normal. Ninguno de los tres genes estudiados mostró una distribución normal por lo que se realizó una transformación angular de los datos (Arcotangente). A continuación, se utilizó un modelo lineal generalizado, empleando 'grupo experimental' como efecto fijo (Control IA, 0h CIV no superovuladas, 0h CIV superovuladas, 24 h CIV superovuladas, 48 h CIV superovuladas asincrónicas y 48 h CIV superovuladas sincrónicas).

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Efectos del cultivo sobre el porcentaje de embriones que se desarrollan *in vivo* a los 6 días y la tasa de supervivencia.

Como puede observarse en la Tabla 3 y en la Figura 10, el grupo de donantes superovuladas y sometidos a 48 h de cultivo *in vitro* y transferidos a receptoras sincrónicas (72 h desde la inducción de la ovulación) presentó un porcentaje de recuperación de blastocistos a 6 días significativamente menor que el resto. Además, los grupos con mayor éxito fueron el control y el grupo de embriones procedentes de donantes no superovuladas y transferidos sin pasar por cultivo *in vitro*, mostrando porcentajes del 71,4 y 75% respectivamente. Cabría destacar que en el grupo control, la estimación se realizó en base a la tasa de ovulación (cuerpos lúteos) de las conejas donantes.

Tabla 3. Efecto del cultivo sobre la tasa de recuperación de blastocistos de 6 días.

| Grupo | Embriones transferidos | Blastocistos 6d (%) |
|------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| Control IA | 70* | 50 (71,4) ^a |
| 0h no CIV superovuladas | 76 | 57 (75,0) ^a |
| 0h CIV superovuladas | 156 | 72 (46,2) ^{bc} |
| 24h CIV superovuladas | 144 | 63 (43,8) ^c |
| 48h CIV superovuladas sincrónicas | 167 | 42 (25,1) ^d |
| 48h CIV superovuladas asincrónicas | 134 | 76 (56,7) ^b |

* Estimado respecto a tasa de ovulación

a, b, bc, c, d, Valores en las columnas con diferente superíndice que difieren estadísticamente tras realizar la prueba de la chi-cuadrado (P < 0.05).

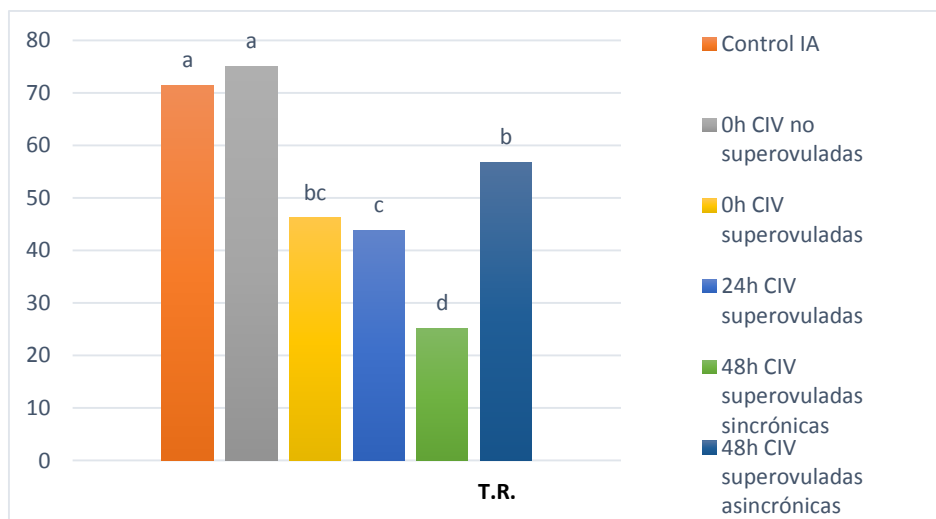


Figura 10. Tasa de blastocistos recuperados a 6 días.

Los resultados obtenidos muestran que el cultivo de embriones afecta a la viabilidad *in vivo* de los mismos tras ser transferidos. Se observa que el número de embriones recuperados

es mayor cuando los embriones se transfieren directamente (grupos 2 y 3) que cuando se cultivan durante 24 h (grupo 4), siendo este número mayor que cuando el cultivo se alarga a 48 h (grupo 5). Estudios previos realizados en conejo como el de Adams (1970), Schneider *et al.* (1982) y Beier *et al.* (1983), mostraron resultados similares exponiendo que la viabilidad después de la transferencia depende del tiempo de cultivo y que pocos embriones sobrevivían si ese tiempo superaba las 24 h. En concreto, Adams (1970) estudió el efecto del cultivo en embriones recuperados a las 60 h p.c. y observó una disminución de un 30% en la tasa de embriones en desarrollo tras realizar la transferencia cuando el tiempo de cultivo se alargó de 24 a 48 h; con tasas de desarrollo del 60,9%, 32,9% y 7% para los embriones cultivados 24, 48 y 72 h, respectivamente. Estas diferencias pueden deberse a un retraso o demora en el desarrollo, lo que conduce a una asincronización entre los embriones y el ambiente materno (Maurer *et al.*, 1970).

Como puede observarse, los embriones cultivados durante 48 h y transferidos a receptoras con una asincronía de 24 h (grupo 6) difieren significativamente del grupo de embriones que con el mismo tratamiento se transfieren a receptoras sincrónicas. Esta diferencia se entiende debido a que los embriones cultivados durante 48 horas no presentan el aspecto propio de los embriones de 72 h.p.c. (mórulas compactas o blastocistos tempranos), sino que más bien se asemejan a mórulas tempranas manifestando cierto retraso en su desarrollo (Fig. 11). Por ello, al realizar la transferencia oviductal de los embriones a conejas receptoras con una asincronía de 24 h, estos disponen de un ambiente oviductal más apropiado. Con ello, de los 134 embriones con cultivo de 48 h transferidos de forma asincrónica 76 se recuperaron a los 3 días de la intervención; mientras que de los 167 embriones con cultivo de 48 h transferidos sincrónicamente solo 42 se recuperaron a los 3 días.

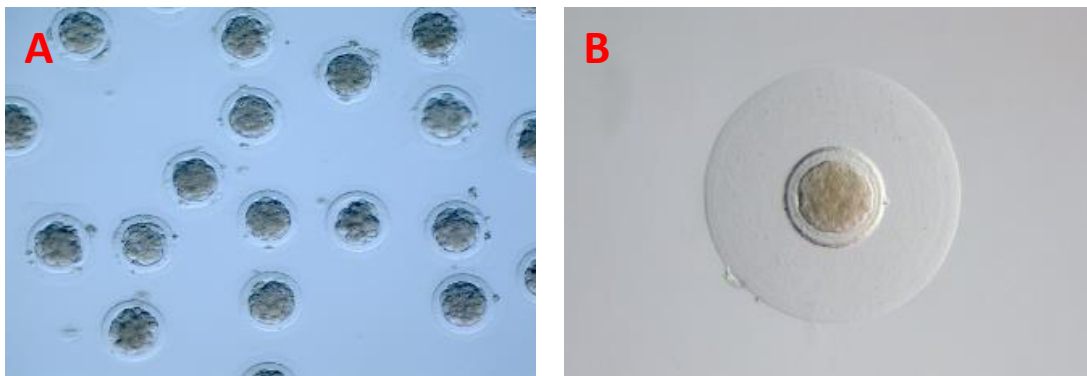


Figura 11. A. Embriones de 24 h *in vivo* + 48 h *in vitro* en estadio de mórula temprana. **B.** Embrión en estadio de mórula compacta (72 h *in vivo*).

El retraso en el desarrollo que sufren los embriones durante el cultivo llevó a que muchos autores optasen generalmente por las transferencias a receptoras asincrónicas (Maurer *et al.*, 1968, 1970). De este modo, Binkerd y Anderson (1979) demostraron que al transferir embriones de 2 a 4 células cultivados durante 70 h a receptoras con una asincronía de 48 h aumentaba la tasa de supervivencia al 12% en comparación con el 0% en la transferencia sincrónica.

Por otro lado, en la Tabla 4 y la Figura 12 se muestran los resultados de las transferencias realizadas con el objetivo de evaluar la tasa de supervivencia. Se observa que el grupo con una tasa de supervivencia significativamente menor que el resto fue el grupo de embriones procedentes de donantes superovuladas y sometidos a 48 h de cultivo in vitro, tras el que fueron transferidos a conejas receptoras sincrónicas. Ninguno de los embriones transferidos pertenecientes a este grupo consiguió nacer. Al igual que sucedía con la viabilidad a los 6 días, los grupos con mayor éxito fueron el control y el grupo de embriones procedentes de donantes no superovuladas y transferidos sin pasar por cultivo in vitro, mostrando porcentajes del 87,5 y 80% respectivamente. Es necesario reseñar, de nuevo, que en el caso, del grupo control la estimación se realizó en base a la tasa de ovulación de las conejas donantes.

Tabla 4. Efecto del cultivo sobre la tasa de supervivencia.

| Grupo | Conejas receptoras | Embriones transferidos | Nacidos (%) |
|------------------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| Control IA | 4 | 40* | 35 (87,5) ^a |
| 0h no CIV superovuladas | 4 | 50 | 40(80,0) ^a |
| 0h CIV superovuladas | 4 | 61 | 33(54,1) ^{bc} |
| 24h CIV superovuladas | 4 | 64 | 25(39,1) ^c |
| 48h CIV superovuladas sincrónicas | 4 | 64 | 0 (0) ^d |
| 48h CIV superovuladas asincrónicas | 4 | 64 | 37(57,8) ^b |

* Estimado respecto a tasa de ovulación

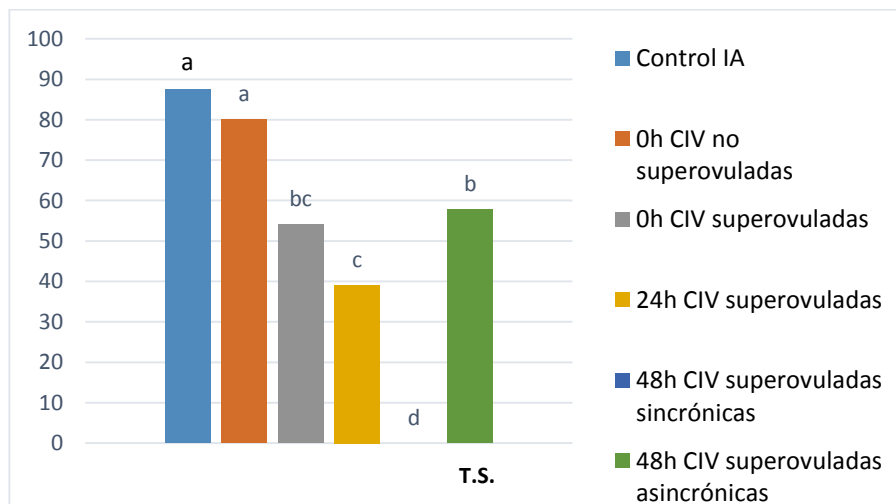


Figura 12. Tasa de supervivencia expresada como el porcentaje de embriones nacidos respecto a los transferidos.

Los resultados de las transferencias, tanto las realizadas para recuperar los embriones a los 6 días como para determinar el porcentaje de nacidos, muestran mayor éxito cuando tras cultivar los embriones 48 h se transfieren a receptoras asincrónicas. En las transferencias asincrónicas los embriones disponen de 24 h más dentro del aparato reproductor de la receptora, permitiendo que durante este tiempo las cubiertas del embrión sufran los cambios

pertinentes que tienen lugar de forma natural durante la expansión del blastocisto entre el día 4 y 5 p.c. hasta el momento de la implantación. Los embriones de conejo no están rodeados únicamente por la capa pelúcida, sino que presentan otra capa formada a partir de secreciones tubáricas conocida como capa de mucina; la cual va siendo remodelada durante la expansión del blastocisto. Algunos autores (Adams, 1970; Nozawa, 1976) han observado en conejo que el cultivo *in vitro* de embriones tempranos impide la transformación de las cubiertas de los mismos que ocurre *in vivo*. Cuando los embriones se cultivan a las 20-22 h.p.c. éstos ya no acumulan más cubierta de mucina, limitando así la implantación de los embriones e impidiendo la gestación. Quizá el periodo de 24 h de más en el oviducto del que disponen los embriones transferidos a hembras asincrónicas puede ayudar a remodelar de forma más efectiva la capa de mucina, favoreciendo de este modo su desarrollo e implantación (Denker, 2000).

4.2 Efectos del cultivo sobre la expresión génica de los blastocistos de 6 días

El análisis estadístico de los datos normalizados mostró un efecto significativo del tiempo de cultivo para la expresión diferencial de los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*. La Tabla 5 y la Figura 13 muestran los resultados obtenidos para cada grupo experimental de los genes estudiados.

Tabla 5. Análisis de los resultados de cuantificación relativa de la expresión génica.

| Grupo | OCT4 | SOX2 | NANOG |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Control IA | 1,304 ^b | 0,427 ^b | 0,524 ^b |
| 0h no CIV superovuladas | 1,487 ^b | 0,654 ^b | 1,147 ^a |
| 0h CIV superovuladas | 1,076 ^b | 0,461 ^b | 0,870 ^a |
| 24h CIV superovuladas | 1,015 ^b | 0,319 ^b | 0,542 ^b |
| 48h CIV superovuladas sincrónicas | 3,044 ^a | 1,792 ^a | 1,346 ^a |
| 48h CIV superovuladas asincrónicas | 4,705 ^a | 5,641 ^a | 1,109 ^a |

Se muestran las medias obtenidas sin transformar los datos.

Previamente se ha podido demostrar que la expresión génica de los embriones en desarrollo puede verse afectada por el ambiente que les rodea, por lo que el cultivo es un factor a tener en cuenta (Wrenzycki et al., 1999). La expresión génica fue empleada para evaluar la calidad de los blastocistos recuperados a los 6 días de la inseminación procedentes de cada uno de los grupos con distintos tratamientos.

Los genes escogidos en este estudio; *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, desempeñan un papel importante en el desarrollo embrionario, por lo que alteraciones en su expresión podrían suponer fallos en el desarrollo y la implantación del embrión, dando lugar a la muerte del mismo. El hecho de que existan diferencias significativas entre los grupos experimentales en la expresión de cada uno de los genes estudiados indica que el cultivo de embriones podría modificar el patrón de expresión de genes relevantes en la proliferación y diferenciación de las células madre embrionarias. Con ello se distorsionaría a corto plazo el desarrollo,

ralentizándose el mismo y podría ser el inicio de algunos de los problemas asociados a la utilización de las técnicas reproductivas, en las que es posible observar, al menos en modelos animales, alteraciones a nivel metabólico en individuos nacidos (Bowman y McLaren, 1970; Khosla *et al.*, 2001).

En la Figura 13 se puede ver que para cada conjunto de datos existen diferencias en la cuantificación relativa de la expresión génica, siendo más notable para los genes *OCT4* y *SOX2*. Para estos dos genes, la expresión del control (grupo 1) se asemeja a la de los conjuntos de embriones que se transfieren sin pasar por cultivo (grupos 2 y 3) y a la de los embriones que se cultivan durante 24 h (grupo 4). No obstante, la expresión de los embriones control difiere significativamente de la de los embriones que permanecieron en cultivo durante 48 h antes de ser transferidos, tanto en el caso de los sincrónicos (grupo 5) como de los asincrónicos (grupo 6).

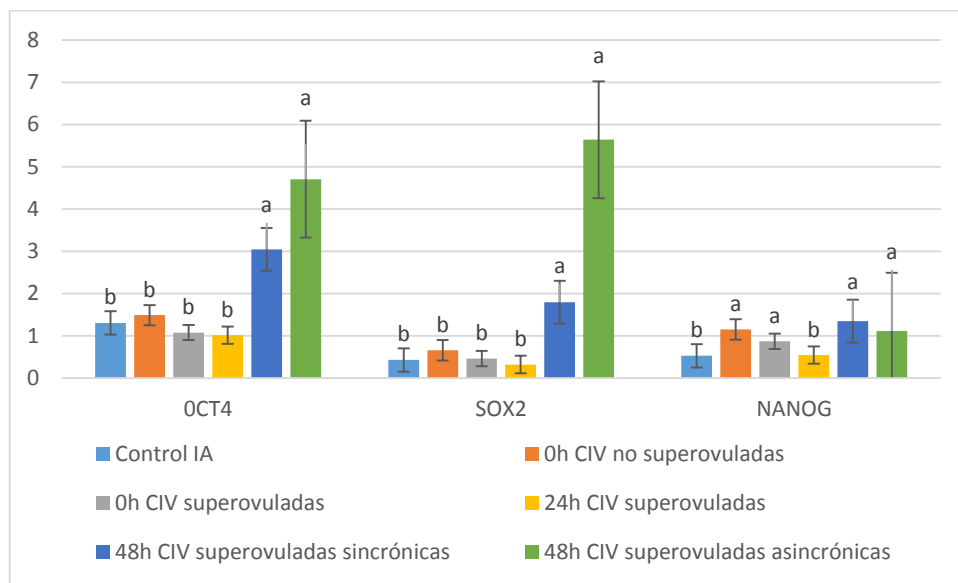


Figura 13. Resumen de los niveles de expresión génica diferencial obtenidos para los embriones procedentes de los distintos tratamientos.

Rizos *et al.* (2008) y Saenz-de-Juano *et al.* (2011) observaron cómo diferentes condiciones de cultivo *in vitro* afectaban a la expresión del ARNm, provocando variaciones en la expresión génica entre embriones desarrollados *in vivo* e *in vitro*. Asimismo, otros estudios han conseguido demostrar que la crioconservación mediante vitrificación produce alteraciones en la metilación del promotor de los genes *OCT4* y *NANOG* en ratón (Zhao *et al.*, 2012). Sin embargo, estas alteraciones no han sido observadas en embriones de conejo vitrificados que alcanzan el estadio de blastocisto tras 3 días de desarrollo *in vivo* (Saenz-de-Juano *et al.*, 2014). Estas observaciones en el cambio del patrón de expresión génica muestran que el retraso en el desarrollo de los embriones no se determina únicamente por los fallos que tienen lugar en la remodelación de la cubierta de mucina.

El gen *POU5F1* codifica para el transcrito *OCT4*, el cual ha sido objeto de estudio en diversos proyectos debido a su relación con la activación y represión de un gran número de genes implicados en el desarrollo embrionario temprano (Smith *et al.*, 2007). En el trabajo de Mamo *et al.*, (2008) se extrajo que los embriones de conejo desarrollados *in vitro* expresaban

el transcrito desde el momento de formación del cigoto y durante todas las fases de su desarrollo. Además, en este mismo estudio se demostró que la expresión aumentaba significativamente desde el estadio de mórula de 8-16 células hasta la formación del blastocisto de 4 días.

De este modo, el aumento significativo de la expresión del OCT4 en los grupos experimentales de embriones cultivados durante 48 h respecto al resto de grupos parece indicar una mayor similitud de los embriones incubados durante mayor periodo de tiempo a los blastocistos de 4 días, donde la expresión de OCT4 presenta valores elevados. Esto respalda las observaciones realizadas en el momento de la recuperación de los blastocistos de 6 días, donde los blastocistos que procedían de una incubación de 48 h presentaban un tamaño menor, propio de blastocistos de 4 y 5 días, del esperado a los 6 días. En los embriones control el tamaño sí que correspondía con el típico de los blastocistos de 6 días, con un diámetro de 2-6 mm aproximadamente (Fig. 14).

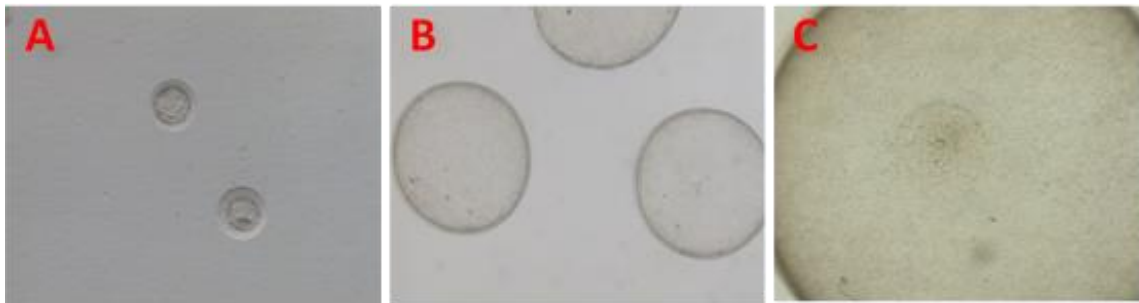


Figura 14. Imágenes obtenidas mediante microscopio esteroscópico a un aumento de 20x. **A.** Embriones de 4 días desarrollados in vivo. **B.** Embriones de 5 días desarrollados in vivo. **C.** Embrión de 6 días desarrollado in vivo.

Uno de los factores con el que interactúa *OCT4* dentro del núcleo es el factor de transcripción de caja de gran movilidad (HMG)-Box *SOX2* regulando su expresión génica (Boiani y Scholer, 2005). El gen *SOX2* juega un papel importante tanto en el mantenimiento de la pluripotencialidad como en la diferenciación de los linajes durante la gastrulación, por lo que su expresión no se limita a células pluripotentes, sino que también se encuentra en los linajes neurales tempranos (Avilion *et al.*, 2003; Boyer *et al.*, 2006).

Al igual que ocurrió con el factor de expresión *OCT4*, la cantidad de transcritos para el *SOX2* aumentó significativamente en los grupos de embriones cultivados durante 48 h respecto del resto, demostrando de nuevo la influencia del cultivo en el desarrollo embrionario.

Los factores de transcripción que se estudian en este trabajo se expresan inicialmente de manera ubicua en todos los blastómeros del embrión en división, pero cuando llegan a la etapa de blastocisto se restringen al interior, a las células ICM. Los procesos de desarrollo cruciales, incluida la proliferación celular, la migración y también el mantenimiento de la pluripotencia y la especificación celular, tanto en el embrión temprano como en las células madre derivadas de embriones están controlados por las rutas de señalización en las que intervienen *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* (Suwinska y Ciemerych, 2011).

De los resultados obtenidos se extrae que los actuales medios y procedimientos de cultivo distan mucho de satisfacer las necesidades del desarrollo embrionario temprano, desencadenando problemas tanto en etapas tempranas del desarrollo del embrión como en los recién nacidos. Diversos trabajos llevados a cabo en ratón, conejo, bovino y vacuno, entre otros llegan a la misma conclusión, demostrando que el cultivo altera diversos parámetros como la expresión génica del embrión, la tasa de implantación o el peso al nacer (Bowman y McLaren, 1970; Lonergan *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2008). Por tanto, es necesario continuar la investigación en este campo para dar con procedimientos de cultivo *in vitro* que no desencadenen los efectos adversos vistos hasta el momento.

El conejo podría ser un modelo adecuado para estudiar si las carencias de los medios y procedimientos ligados a las técnicas de reproducción asistida tendrán efectos sobre los individuos nacidos de los mismos y si tendrá consecuencias transgeneracionales.

CONCLUSIONES

De la discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- ❖ Los embriones sometidos a cultivo *in vitro* presentan una menor viabilidad *in vivo*, tras ser transferidos a hembras receptoras, en términos de porcentaje de blastocistos desarrollados a 6 días y nacimiento. Los resultados de la transferencia asincrónica ponen de manifiesto el retraso de su desarrollo tras su paso por el cultivo durante 48h.
- ❖ El cultivo durante 48h de cigotos modifica su desarrollo viéndose ralentizado y consecuentemente se observa una sobre-expresión de los genes de pluripotencialidad *OCT4* y *SOX2*.

5. BIBLIOGRAFÍA

Adams, C.E. The development of rabbit eggs after culture in vitro for 1-4 days. *J. Embryo. Exp. Morphol.*, 23: 21-34 (1970)

Alliston, C., howarth, B. and ulberg, L. Embryonic mortality following culture in vitro of one- and two-cell rabbit eggs at elevated temperatures. *Reproduction*, 9(3), 337-341 (1965)

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 17:126-140 (2003)

Bank, H. and Maurer, R. Survival of frozen rabbit embryos. *Experimental Cell Research*, 89(1), 188-196 (1974)

Beebe, D., Wheeler, M., Zeringue, H., Walters, E. and Raty, S. Microfluidic technology for assisted reproduction. *Theriogenology*, 57(1), 125-135 (2002)

Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Kreuzer BR, Medrano JF, Murray JD. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*; 44:227–232 (1995)

Beier, H.M., Mootz, V., Fischer, B. and StrSbele-Milller, R. Growth and differentiation of rabbit blastocysts in defined culture media. In: H.M. Beier and H.R. Lindner (Editors), *Fertilization of the Human Egg in vitro*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 371-386 (1983)

Besenfelder U., Brem G. Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J Reprod Fertil*, 99:53–56 (1993)

Biggers, J. *The Mammalian preimplantation embryo*. New York: Barry D Bavister, Chaper 1 (1987)

Biggers, J. D., Whitten, W. K. & Whittingham, D. G. The culture of mouse embryos in vitro. In: *Methods in Mammalian Embryology*. Ed. J. C. Daniel. Freeman, San Francisco (1968)

Binkerd, P.E. and Anderson, G.B. Transfer of cultured rabbit embryos. *Gamete Res.*, 2: 65-73 (1979)

Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:872-884 (2005)

Bolton, V.N., Wren, M.E. and Parsons, J.H. Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil. Steril.*, 55, 830–832 (1991)

Bowman, P., & McLaren, A. Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. *Development*, 23(3), 693–704 (1970)

Boyer, L. A., Mathur, D., & Jaenisch, R. Molecular control of pluripotency. *Current Opinion in Genetics and Development*, 16(5), 455–462 (2006)

Brousseau ME, Hoeg JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res.*; 40:365-75 (1999)

- Colombo, T. and Zago, L. El conejo. Barcelona: De Vecchi Ediciones (2017)
- Cortell, C. Efecto de la aplicación de gonadotropinas recombinantes humanas sobre la producción y la calidad de los ovocitos y embriones de coneja. Tesis Doctoral en Ciencia Animal. Universitat Politècnica de València. p. 22(2012)
- Daniel JC, Jr, ed. *Methods in Mammalian Embryology*. WH Freeman Co., San Francisco (1971)
- Denker HW. Implantation. The role of proteinases, and blockage of implantation by proteinase inhibitors. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* 53 3–123 (1977)
- Denker, H. Structural Dynamics and Function of Early Embryonic Coats. *Cells Tissues Organs*, 166(2), 180-207 (2000)
- Driancourt, M. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211-1239 (2001)
- Duval M. Le placenta des rongeurs: Le placenta du lapin. *Journal de L'Anatomie et de la Physiologie Normales et Pathologiques de L'Homme et des Animaux* 25 573–627 (1889)
- Elder, K. and Dale, B. *In-vitro fertilization*. 3ª ed. Estados Unidos de América, 119 (2011)
- Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*; 55:151–170 (2001)
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A. and Duranthon, V. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1), 1-10 (2012)
- Fischer, B. and Meuser-Odenkirchen, G. A 2 year follow-up of effects of biotechniques on reproduction in the domestic rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Laboratory Animals*, 22(1), 5-15 (1988)
- Fischer B, Winterhager E & Busch LC. Transformation of endometrium and fertility in late stages of pseudopregnancy in the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78, 529–540 (1986)
- Foote RH, Simkin ME. Use of gonadotropic releasing hormone for ovulating the rabbit model. *Lab Anim Sci* 43:383–5 (1993)
- Foote, R. and Carney, E. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. *Reproductive Toxicology*, 14(6), 477-493 (2000)
- García-Ximénez, F., Vicente, J.S. Effect of ovarian cystic or haemorrhagic follicles on embryo recovery and survival after transfer in hCG-ovulated rabbits. *Reprod. Nutr. Dev.* 32, 143–149 (1992)
- Gardner, D. and Lane, M. Fertilization and early embryology: Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Human Reproduction*, 11(12), 2703-2712 (1996)

- Gardner, D. and Lane, M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?. *Human Reproduction Update*, 3(4), 367-382 (1997)
- Gardner DK & Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod Biomed Online*; 6: 470-481 (2003)
- Gardner, D. and Lane, M. Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reproduction, Fertility and Development*, 17(3), 361 (2005)
- Hafez, E.S.E. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. Cedro 512, México A, D.F. México (1984)
- Halacheva, V., Fuchs, M., Dönitz, J., Reupke, T., Püschel, B. and Viebahn, C. Planar cell movements and oriented cell division during early primitive streak formation in the mammalian embryo. *Developmental Dynamics*, 240(8), 1905-1916 (2011)
- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 195:231–272 (1992)
- Han, C., Zhang, Q., Ma, R., Xie, L., Qiu, T., Wang, L., Mitchelson, K., Wang, J., Huang, G., Qiao, J. and Cheng, J. Integration of single oocyte trapping, in vitro fertilization and embryo culture in a microwell-structured microfluidic device. *Lab on a Chip*, 10(21), 2848 (2010)
- Hansen, P. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, 68, S242-S249 (2007)
- Hashimoto, S., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Takahashi, R., Ueda, M., Hirao, M., Kamei, M., Kitada, K. and Hirasawa, K. Refined Porcine Follicle Stimulating Hormone Promotes the Responsiveness of Rabbits to Multiple-Ovulation Treatment. *Experimental Animals*, 53(4), 395-397 (2004)
- Heo, Y., Cabrera, L., Bormann, C., Shah, C., Takayama, S. and Smith, G. Dynamic microfunnel culture enhances mouse embryo development and pregnancy rates. *Human Reproduction*, 25(3), 613-622 (2010)
- Hickman DL, Beebe DJ, Rodriguez-Zas SL, Wheeler MB. Comparison of static and dynamic medium environments for culturing of preimplantation mouse embryos. *Comparative Med*, 52, 122–126 (2002)
- Hohn HP, Mootz U, Denker HW. Development of rabbit preimplantation blastocysts cultured with precultured endometrial tissue. *J Reprod Fert*, 95, 409-420 (1992)
- Joly, T. Etablissement d'une cryobanque de semence ou d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez les mammifères domestiques: L'exemple du lapin (*Oryctolagus cuniculus*). In Institut National des Sciences Appliquées, Vol. Tesis Lyon (1997)
- Joly, T., Vicente, J. S., Theau-Clément, M., García-Ximénez, F., Besenfelder, U. and Renard, J. Cryopreservation of genetic resources in rabbit species: practical application. In 6th World Rabbit Congress, Vol. 2 Toulouse, 293-298 (1996)

- Kennelly JJ, Foote RH. Superovulatory response of pre- and postpubertal rabbits to commercially available gonadotrophins. *J Reprod Fertil*; 9:177–88 (1965)
- Khosla, S., Dean, W., Reik, W., & Feil, R. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Human Reproduction Update*, 7(4) (2001)
- Kieslinger, D., Hao, Z., Vergouw, C., Kosteljik, E., Lambalk, C. and Le Gac, S. In vitro development of donated frozen-thawed human embryos in a prototype static microfluidic device: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, 103(3), 680-686 (2015)
- Lavara, R., Baselga, M., Marco-Jiménez, F. and Vicente, J. Long-term and transgenerational effects of cryopreservation on rabbit embryos. *Theriogenology*, 81(7), 988-992 (2014)
- Le Gac, S. and Nordhoff, V. Microfluidics for mammalian embryo culture and selection: where do we stand now? *Molecular Human Reproduction* (2016)
- Lewis, W.H., and Gregory, P.W. Cinematographs of living developing rabbit-eggs, *Science* 69: 226-229 (1929)
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T. and Boland, M. Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression Patterns. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 259-267 (2003)
- Mamo, S.; Gal, A.B.; Polgar, Z.; Dinnyes, A. Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5f1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology*, 9: 67 (2008)
- Marco, F.; Vicente, J.S.; Lavara, R.; Balasch S.; Viudes de Castro, M.P. (2010). Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Repro Domest Anim*, 45(5): 118-123
- Maurer, R.E., Hafez, E.S.E., Ehlers, M.H. and King, J.R. Culture of two-cell rabbit eggs in chemically defined media. *Exp. Cell Res.*, 52: 293-300 (1968)
- Maurer, R.R., Whitener, R.H., and Foote, R.H. Relationship of in vivo gamete aging and exogenous hormones to early embryo development in rabbits, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131: 882-885 (1969)
- Maurer, R.R., Onuma, H. and Foote, R.H. Viability of cultured and transferred rabbit embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 21: 417-422 (1970)
- McArdle, A., Denton, K., Maduwegedera, D., Moritz, K., Flower, R. and Roberts, C. Ontogeny of Placental Structural Development and Expression of the Renin–Angiotensin System and 11 β -HSD2 Genes in the Rabbit. *Placenta*, 30(7), 590-598 (2009) Foygel, K., Leong, D., Quake, S. and Yao, M. In vitro embryo culture in defined, sub-microliter volumes. *Developmental Dynamics*, 238(4), 950-955 (2009)

- Medvedev, S.P.; Shevchenko, A.I.; Mazurok, N.A.; Zakian, S.M. (2008). OCT4 and NANOG are the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. *Russian Journal of Genetics*, 44(12): 1589-1608 (2008)
- Mehaisen, G. M., Vicente, J. S., Lavara, R. and Viudes-de-Castro, M. P. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development postvitrication in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci*, 90, 175-184 (2005)
- Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madden JD. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod*; 24:300–307 (2009)
- Navarrete-Santos, A.; Tonak, S.; Kirstein, M.; Kietz, S.; Fischer, B. Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction Research*, 128: 503-515 (2004)
- New, D. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biological Reviews*, 53(1), 81-122 (1978)
- Nichols, J.; Zevnik, B.; Anastasiadis, K.; Niwa, H.; Klewe-Nebenius, D.; Chambers, I.; Schöler, H.; Smith, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3): 379-391 (1998)
- Nozawa, A. Studies on the blastocyst membrane of the rabbit. *Jpn J Fertil Steril* 21: 359–369 (1976)
- Onuma, H., Maurer, R.R., and Foote, R.H. In vitro culture of rabbit ova from early cleavage stages to the blastocyst stage, *J. Reprod. Fertil.* 16: 491-494 (1968)
- Palmer, S., McKenna, S. and Arkinstall, S. Discovery of new molecules for future treatment of infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 10, 45-54 (2005)
- Pfaffl, M.W. Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: *A-Z of Quantitative PCR*. S.A.Bustin, editor. International University Line. La Jolla; p. 87-112 (2004)
- Pincus, G. Observations on the living eggs of rabbits, *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 107: 132-167 (1930)
- Pincus, G. Superovulation in rabbits. *The Anatomical Record*, 77(1), 1-8 (1940)
- Pool, T. An Update on Embryo Culture for Human Assisted Reproductive Technology: Media, Performance, and Safety. *Seminars in Reproductive Medicine*, 23(04), 309-318 (2005)
- Raty, S., Walters, E., Davis, J., Zeringue, H., Beebe, D., Rodriguez-Zas, S. and Wheeler, M. Embryonic development in the mouse is enhanced via microchannel culture. *Lab on a Chip*, 4(3), 186 (2004)
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., de la Fuente, J., Boland, M. and Lonergan, P. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst

Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression¹. *Biology of Reproduction*, 68(1), 236-243 (2003)

Rizos, D.; Clemente, M.; Bermejo-Álvarez, P.; De la Fuente, J.; Lonergan, P.; Gutiérrez-Adán, A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim.*, 43(4): 44-50 (2008)

Rodríguez, H. I. Aspectos reproductivos en los conejos. Servicio de extensión agrícola de la Universidad de Puerto Rico 1999 [Internet] Consultado el 17 de Mayo de:
<https://www.uprm.edu/agricultura/sea/publicaciones/AspectosReproductivosConejos.PDF>

Saenz-de-Juano, M.D.; Naturil-Alfonso, C.; Vicente, J.S.; Marco-Jiménez, F. Effect of different culture systems on ARNm expression in developing rabbit embryos. *Zygote*, 21(1): 103-10 (2011)

Saenz-de-Juano, M.D.; Peñaranda, D.S.; Marco-Jiménez, F.; Vicente, J.S. Does vitrification alter the methylation pattern of OCT4 promoter in rabbit late blastocyst? *Cryobiology*, 69(1): 178-180 (2014)

Schafer-Haas A, Viebahn C. The term cell epitope PG-2 is expressed in primordial germ cells and in hypoblast cells of the gastrulating rabbit embryo. *Anat Embryo*, 202:13–23 (2000)

Schneider, U., A1-Hasani, S., Hahn, J. and Dankowski, K. Technical aspects and perspectives of embryo transfer in laboratory animals. 2e Congr. Int. Transfert d'Embryons chez les Mammifères, 20-22 Sept., Annecy, France, 215 (1982)

Shi, G.; Jin, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(5): 39 (2010)

Stübinger, S. and Dard, M. The Rabbit as Experimental Model for Research in Implant Dentistry and Related Tissue Regeneration. *Journal of Investigative Surgery*, 26(5), 266-282 (2013)

Suwinska, A. and Ciemerych, M. Factors Regulating Pluripotency and Differentiation in Early Mammalian Embryos and Embryo-derived Stem Cells. In: *Vitamins and Hormones*. Gerald Litwack, 1-37 (2011)

Thompson, J., Simpson, A., Pugh, P., Donnelly, P. and Tervit, H. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Reproduction*, 89(2), 573-578 (1990)

Van Blerkom, J., Manes, C. and Daniel, J. Development of preimplantation rabbit embryos in vivo and in vitro. *Developmental Biology*, 35(2), 262-282 (1973)

Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P., García, M.L., Baselga, M. Effect of rabbit line on a program of cryopreserved embryos by vitrification. *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 137–143 (2003)

Vicente, J.S.; Lavara, R.; Marco, F.; Viudes de Castro, M.P. Detrimental effect on availability of buserelin acetate administrated in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76(6): 1120-1125 (2011)

- Vicente Antón, JS.; Parrilla-Ocon, A.; Saenz De Juano Ribes, MDLD.; Naturil Alfonso, C.; Marco Jiménez, F. First steps of in vitro gastrulation in rabbit vitrified embryos. *Cryo Letters*. 36(2):128-136 (2015)
- Viebahn C, Mayer B, Hrabe de Angelis M. Signs of the principle body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anat Embryol*, 192:159– 169 (1995)
- Viebahn C. Gastrulation in the rabbit. *Gastrulation: from cells to embryo*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2004)
- Viudes-de-Castro, M.P., García-Ximénez, F., Vicente, J.S. Embryo recovery from eliminating does of three selected rabbit strains for an embryo bank. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Anim*. 10, 145–152 (1995)
- Viudes de Castro MP. *Fisiología Reproductiva de la coneja*. Parte 1. [Recurso Audiovisual Polimedia UPV]. Universidad Politécnica de Valencia (2008)
- Viudes-de-Castro, M., Marco-Jiménez, F., Cedano-Castro, J. and Vicente, J. Effect of corifollitropin alfa supplemented with or without LH on ovarian stimulation and embryo viability in rabbit. *Theriogenology*, 98, 68-74 (2017)
- Wang W-H, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling–rearming observed using polarized light microscopy. *Hum Reprod*; 16:2374–2378 (2001)
- Wang W-H, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril*; 77:1274–1277 (2002)
- Wang, S.; Tang, X.; Niu, Y.; Chen, H.; Li, B.; Li, T.; Zhang, X., Hu, Z., Zhou, Q.; Ji, W. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25: 481- 489 (2007)
- Weltzien, F.A.; Pasqualinib, C.; Vernierb, P.; Dufoura S. A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2): 134-142 (2005)
- Williams, B. and Biggers, J. Polar trophoblast (Raubers' layer) of the rabbit blastocyst. *The Anatomical Record*, 227(2), 211-222 (1990)
- Whitten, W. and Biggers, J. Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *Reproduction*, 17(2), 399-401 (1968)
- Whitten WK. The effect of oxygen on cleavage of mouse eggs. *Abstracts of 2nd Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, Davis, California*, p. 29 (1969)
- Whitten WK. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Adv Biosci*; 6:129–139 (1971)
- Whittingham, D. and Biggers, J. Fallopian Tube and Early Cleavage in the Mouse. *Nature*, 213(5079), 942-943 (1967)

Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J.W. et al. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in pre-implantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 8–18 (1999)

Young L.E., Butterwith S.C. and Wilmot I. Increased ovine fetal weight following transient asynchronous embryo transfer is not associated with increased placental weight at day 21 of gestation *Theriogenology* 45 231 (1996)

Zhao, X.M.; Du, W.H.; Hao, H.S.; Wang, D.; Qin, T.; Liu, Y.; Zhu, H.B. Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*, 79(7): 445-450 (2012)