

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

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



Trabajo Final de Grado

**Efecto de la manipulación embrionaria temprana  
sobre la descendencia**

**Grado en Biotecnología**

Curso 2018/2019

Alumno: Josep Zafrilla Martínez

Tutor académico:  
Francisco Marco-Jiménez

Valencia, Julio 2019



**Título del TFG:**

Efecto de la manipulación embrionaria temprana sobre la descendencia

**Alumno:** D. Josep Zafrilla Martínez

**Tutor Académico:** Prof. D. Francisco Marco-Jiménez

Valencia, Julio 2019

**RESUMEN**

El uso de las técnicas de reproducción asistida (TRA) ha aumentado mucho en años recientes ya que permiten encontrar una solución a los muchos casos de parejas con infertilidad. No obstante, existen muchos estudios que indican que las TRA no son inocuas, y se asocian a varias alteraciones observadas en la descendencia. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la transferencia embrionaria sobre la paternidad de la descendencia obtenida utilizando inseminación artificial con mezcla heterospérmica y la calidad embrionaria determinada mediante la expresión de mRNA de genes pluripotentes (OCT4, Sox2 y Nanog).

Para llevar a cabo el estudio se realizaron tres sesiones de inseminaciones artificiales con mezcla heterospérmica de 4 machos y se recuperaron los embriones a las 24 horas de la misma. Los embriones recuperados se transfirieron a una hembra receptora y se volvieron a recuperar 6 días después de la inseminación. Para determinar la paternidad de la descendencia se llevó a cabo una amplificación y secuenciación de 5 microsatélites que permitieron obtener el parentesco de los embriones. Para evaluar la calidad embrionaria se analizaron los niveles de expresión de los genes pluripotentes Oct4, Sox2 y Nanog mediante una amplificación a tiempo real.

Los resultados del estudio no mostraron variaciones en la paternidad de la descendencia obtenida de una inseminación con mezcla heterospérmica. No obstante, sí se observó un descenso en la calidad embrionaria en términos de una disminución significativa en los niveles de expresión del gen Sox2.

**PALABRAS CLAVE**

Conejo; embrión; blastocisto; expresión génica; manipulación embrionaria; desarrollo embrionario; paternidad; técnicas de reproducción asistida; transferencia embrionaria; microsatélite

**Title:**

Effect of the early embryo manipulation on offspring.

**ABSTRACT**

The use of assisted reproduction techniques (ART) has increased a lot in recent years as they allow finding a solution to the many cases of infertile couples. However, there are many studies that indicate that ART are not innocuous, and are associated with several alterations observed in offspring. The objective of this study is to evaluate the effect of embryo transfer on the paternity of offspring obtained using artificial insemination with heterospermic mixture and embryo quality determined by the expression of pluripotent gene mRNA (OCT4, Sox2 and Nanog).

To carry out the study, three sessions of artificial inseminations with heterospermic mixture of 4 males were carried out and the embryos were recovered 24 hours later. The recovered embryos were transferred to a recipient female and recovered again 6 days after the insemination. To determine the paternity of the offspring, an amplification and sequencing of 5 microsatellites was carried out to obtain the kinship of the embryos. To evaluate the embryo quality, the levels of expression of the pluripotent genes Oct4, Sox2 and Nanog were analyzed by real time amplification

The results of the study showed no variation in the paternity of the offspring obtained from an insemination with heterospermic mixture. However, a decrease in embryo quality was observed in terms of a significant decrease in the expression levels of the Sox2 gene.

**KEYWORDS**

Rabbit; embryo; blastocyst; gene expression; embryo manipulation; embryonic development; paternity; assisted reproduction techniques; embryo transfer; microsatellite

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se ha realizado con mucho esfuerzo, mucha dedicación, y mucho sacrificio. Sin embargo, es innegable la importancia que ha tenido en su realización el apoyo de todos aquellos que me rodean. A todos ellos les quiero dar las gracias.

Es justo empezar por el principio, por mis padres. Ellos han sido una pieza fundamental en mi vida desde el principio, y han supuesto un punto de apoyo durante estos meses mucho más importante de lo que ellos mismos creen. Gràcies per tot, hui i sempre.

Agradecer a la totalidad del departamento de ciencia animal de la UPV por su ayuda y su dedicación. Especialmente a Amparo y a Ximo, por su cercanía y amabilidad, así como a David y a Paco, por su disponibilidad, su paciencia, y por ser la guía que necesitábamos. Gracias.

Por supuesto he de nombrar a todos los compañeros que han estado en el laboratorio durante todo el trabajo. David, Zaida, Paula, Noelia, Laura, Belén y, por supuesto, mi equipo de trabajo, Jorge y Almu. Me siento obligado a hacer una mención especial a Belén, mi inestimable compañera de piso, y Almu, el mayor apoyo y la mejor amiga que he tenido estos 4 años. Sois las mejores. Gracias.

Gracias a todos los que no he nombrado pero me habéis rodeado en algún momento de este trayecto. Podéis daros por aludidos, todos habéis contribuido de alguna forma. Gracias.

Y no puedo terminar sin dar las gracias a Gema, que ha sido una amiga indispensable desde que apareció en mi vida, que siempre me ha animado y me ha hecho mejor persona, y que me ayudó a recuperarme cuando todo parecía muy negro. Gracias.

¡Gracias a todos!

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Infertilidad.....	1
1.2. Técnicas de reproducción asistida (TRA).....	2
1.3. Efectos de las técnicas de reproducción asistida.....	3
1.4. La transferencia embrionaria .....	5
2. Objetivos.....	8
3. Materiales y métodos.....	9
3.1. Animales.....	9
3.2. Obtención de embriones.....	9
3.2.1. Tratamiento de superovulación.....	9
3.2.2. Inseminación de las hembras.....	10
3.2.3. Recuperación de embriones de donante y transferencia a hembras receptoras.....	12
3.2.4. Recuperación de blastocistos en día 6.....	15
3.3. Análisis de parentesco.....	16
3.3.1. Extracción del ADN.....	16
3.3.2. Amplificación del ADN mediante PCR y secuenciación de los microsatélites .....	16
3.3.3. Establecimiento de parentescos de la descendencia .....	18
3.4. Análisis de la expresión génica para genes de pluripotencialidad .....	19
3.4.1. Extracción del ARNm de las muestras y retrotranscripción .....	19
3.4.2. Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR) .....	19
3.5. Análisis estadístico .....	21
3.6. Diseño experimental .....	22
4. Resultados .....	23
4.1. Recuperación de embriones .....	23
4.2. Análisis de la calidad espermática.....	23
4.3. Análisis de parentesco.....	24
4.4. Análisis expresión génica.....	25
5. Discusión .....	27
6. Conclusiones .....	29
7. Bibliografía .....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Fotografía de conejos de la UPV con origen California.

**Figura 2.** Cámara Thoma-Zeiss empleada para determinar la concentración espermática.

**Figura 3.** Fotografías del proceso de perfundir el tracto reproductivo.

**Figura 4.** Embriones recuperados a las 24 horas en estado de pronúcleos.

**Figura 5.** Ovario de hembra de conejo superovulada extraído a las 24 horas de inducir la ovulación en la que se pueden apreciar los cuerpos lúteos empleados para obtener la TO.

**Figura 6.** Fotografía del proceso de transferencia mediante laparoscopia.

**Figura 7.** Deposición de los embriones en el oviducto mediante laparoscopia.

**Figura 8.** Blastocistos de conejo recuperados a día 6.

**Figura 9.** Ejemplo de perfil heterocigoto obtenido para el microsatélite INRACCDDV0087.

**Figura 10.** Esquema del diseño experimental.

**Figura 11.** Tasa de supervivencia de los embriones transferidos y control expresada en porcentaje.

**Figura 12.** Número de descendientes asignados a cada parental.

**Figura 13.** Ratio de expresión de los genes de pluripotencia en embriones control y transferidos.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Datos bibliográficos sobre los microsatélites empleados.

**Tabla 2.** Condiciones de amplificación para los diferentes microsatélites.

**Tabla 3.** Programa de tiempos empleados durante la retrotranscripción.

**Tabla 4.** Información bibliográfica sobre los genes empleados para el análisis génico.

**Tabla 5.** Programa empleado para la amplificación a tiempo real.

**Tabla 6.** Valores obtenidos para los parámetros de calidad espermática evaluados. Valores expresados como media  $\pm$  error típico.

**Tabla 7.** Genotipo de los diferentes parentales para los microsatélites estudiados.

## ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario

**ALH:** amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BCF:** frecuencia de batido de la cabeza

**BSA:** albúmina sérica bovina

**CTP:** corifolitropina

**DNMT:** ADN metil transferasa

**dNTPs:** desoxinucleótidos trifosfatos

**DPBS:** tampón fosfato salino de Dulbecco

**eCG:** *gonadotropina coriónica equina*

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**FIV:** fecundación *in vitro*

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropinas

**hCG:** *gonadotropina coriónica humana*

**IA:** inseminación artificial

**ICSI:** inyección intracitoplasmática de espermatozoides

**LIN:** índice de linealidad

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**rFSH:** hormona folículo estimulante recombinante

**SNP:** polimorfismo de nucleótido único

**STR:** índice de rectitud

**TO:** tasa de ovulación

**TR:** tasa de recuperación

**TRA:** técnicas de reproducción asistida

**UI:** unidades internacionales

**VAP:** velocidad media



**VCL:** velocidad curvilínea

**VSL:** velocidad rectilínea

**WOB:** índice de oscilación

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Infertilidad

La infertilidad, según la OMS, se define como la incapacidad de concebir un embarazo clínico tras 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección (Zegers-Hochschild et al., 2009). Se trata de una patología que afecta aproximadamente al 10-15% de las parejas en la edad reproductiva (15-44 años), de tal forma que, solamente en Estados Unidos, ha llevado a un 12% de las parejas a buscar asistencia médica para lograr el embarazo (Luke, 2017).

La edad es uno de los factores más importantes por los que cada vez más parejas infértiles acuden a clínicas de reproducción asistida, afectando especialmente a las mujeres (George y Kamath, 2010). En su nacimiento, una mujer tiene alrededor de 5 millones de folículos primordiales, cifra que desciende a 500.000 en la menarquía, 25.000 alrededor de los 37 años y 1000 al aproximarse a la menopausia (Faddy et al., 1992). Es por ello que se ha asociado una reducción en la fertilidad en las mujeres asociada a la edad, empezando alrededor de los 32 años y con una caída notable a los 37 (Spandorferl et al., 1998). Aunque clásicamente no se ha asociado la edad paterna a la fertilidad, se ha observado que una avanzada edad aumenta la tasa de fragmentación del ADN espermático, por lo que la edad paterna también puede afectar a las tasas de embarazo (Albani et al., 2019). De forma conjunta, se ha asociado una avanzada edad de ambos parentales con abortos espontáneos, anomalías congénitas o desórdenes genéticos, tales como síndrome de Down (De La Rochebrochard y Thonneau, 2002; Zhu et al., 2005). Por otro lado, factores como el sobrepeso y la obesidad se han relacionado con la infertilidad en mujeres, debido a alteraciones del ciclo menstrual, disfunciones ovulatorias y alteraciones funcionales del endometrio (ASRM, 2015), resultando en un descenso de la tasa de embarazos y un aumento en la tasa de abortos (Provost et al., 2016). Respecto a los hombres existe controversia, pues mientras algunos estudios describen efectos negativos sobre la capacidad fecundante en individuos con obesidad (Campbell et al., 2015), otros no encuentran una relación directa (Bandel et al., 2015). En mamíferos, el sobrepeso en machos se ha asociado con una menor concentración de espermatozoides en el eyaculado, así como con una reducción significativa en la capacidad fecundante (Marco-Jiménez y Vicente, 2017).

El factor genético ha sido asociado con el 50% de los casos de infertilidad. Si bien para una gran cantidad de pacientes no es posible encontrar una causa genética, debido principalmente a que solo se conocen unos pocos genes o defectos génicos asociados a la enfermedad (Zorrilla y Yatsenko, 2013). Las anomalías cromosómicas son la mayor causa de infertilidad masculina, presentes en aproximadamente el 15% de los pacientes azoospermicos. En este grupo se encuentran aneuploidias, definidas como la presencia de un número anormal de copias cromosómicas, ya sean más o menos que el estado normal euploide (Flannigan y Schlegel, 2017). Las aneuploidías más comunes afectan a los cromosomas sexuales X e Y, así como los cromosomas 13, 18 y 21 (Piomboni et al., 2014). Algunos de los casos más

comunes son el síndrome de Klinefelter (47, XXY), el síndrome XYY o la disgenesia gonadal mixta (45,X/46,XY) (Flannigan et al., 2014; Walsh et al., 2009). La infertilidad femenina también se debe en muchos casos a anomalías en el número de copias de los cromosomas, destacando el síndrome de Turner o monosomía de X (45,X) y la trisomía de X (47,XXX), que se han relacionado con el fallo ovárico y con la insuficiencia ovárica prematura (Simpson y Rajkovic, 1999; Tartaglia et al., 2010). El segundo gran grupo de anomalías cromosómicas relacionadas con infertilidad masculina son las anomalías estructurales, que incluyen microdeleciones del cromosoma Y con genes responsables de la espermatogénesis (Reijo et al., 1995), translocaciones robertsonianas, consistentes en la formación de un aparente cromosoma derivado de la unión de dos cromosomas acrocéntricos (Scriven et al., 2001), translocaciones recíprocas o balanceadas, que involucran un intercambio de material genético entre dos o más cromosomas (Flannigan y Schlegel, 2017).

Actualmente, se han identificado diversos genes relacionados con la infertilidad. Entre ellos se ha descrito el *NOS3*, sintasa relacionada con la regulación del estrés oxidativo en el tejido testicular cuya mutación puede provocar fenotipos oligoastenozoospermicos (Vučić et al., 2017). El gen *HSF2*, factor de transcripción relacionado con la embriogénesis y espermatogénesis y cuya mutación y disrupción provoca azoospermia y letalidad embrionaria (Mou et al., 2013; Wang et al., 2003). Polimorfismos en el gen *ESR1*, receptor de estrógenos en mujeres, también están relacionados con casos de infertilidad (Swaminathan et al., 2016). Otros genes autosómicos mutados asociados con el fallo ovárico prematuro han sido el *RABL2B* (Hosseini et al., 2017) y el *NOBOX* (Qin et al., 2007).

## **1.2. Técnicas de reproducción asistida (TRA)**

Actualmente, existen tres posibles estrategias para abordar la infertilidad, incluyendo tratamientos farmacológicos, tratamientos quirúrgicos y las técnicas de reproducción asistida (TRA). Las TRA incluyen técnicas de fecundación del ovocito con semen *in vitro*, como la fecundación *in vitro* (FIV) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), y técnicas como la inseminación artificial (IA), inseminación intrauterina o la inducción de la ovulación (Luke, 2017). Las TRA han supuesto un gran avance en el tratamiento de la infertilidad desde el nacimiento de Louise Brown en 1978 (conocido como el niño probeta) y que han permitido el nacimiento de cientos de miles de niños en todo el mundo (Szamatowicz, 2017). Entre el 1 y el 4% de niños nacidos en los países desarrollados han sido tras la aplicación de estas TRAs, y las tasas de éxito han ido aumentando gracias a la introducción de otras técnicas como son la criopreservación o la ICSI (Cabañas et al., 2009; Canovas et al., 2017). En Europa, en 2010 se realizaron un total de 237.120 ciclos de tratamientos de reproducción asistida en 14 países distintos. En 2012, la cifra fue de 369.081 ciclos en 18 países, y en 2014, un total de 291.235 tratamientos en 16 países. Esto corresponde a 1.221 ciclos de TRA por millón de habitantes en 2010, 1252 en 2012 y 1925 en 2014 (Kupka et al., 2014; Calhaz-Jorge et al., 2016; De Geyter et al., 2018). En Estados Unidos, en 2014 se realizaron 169.568 tratamientos de reproducción asistida con más de 56.000 niños nacidos. Esta cifra aumentó en 2015 hasta los 182.111

tratamientos, y en 2016 hasta los 197.706 y 76.892 niños nacidos. En 2016, por cada millón de mujeres en edad reproductiva (15-44 años), 3.075 se sometieron a procedimientos de TRA, mientras que en 2015 y 2014 las cifras fueron de 2.832 y 2.647, respectivamente. En 2016 el número de embriones transferidos por ciclo de tratamiento aumentó con la edad, siendo una media de 1,5 embriones en mujeres menores de 35 años, 1,7 en mujeres de 35-37 años, y 2,2 en mujeres mayores de 37 años, cifras ligeramente menores que en 2015. En general, el porcentaje de partos dobles ha disminuido del 33,9% al 30,4%, y el porcentaje de trillizos o más ha disminuido del 1,4% al 1,1% entre 2015 y 2016, respectivamente. Estos datos suponen un 1,8% de los nacimientos en Estados Unidos en 2016, cifra que ha triplicado el número de tratamientos y nacimientos desde 1996, año en que 20.597 niños nacieron mediante TRA (Sunderam et al., 2017:2018:2019). Estos datos evidencian un incremento masivo en la popularidad de las técnicas de reproducción asistida y el aumento en la dificultad de las parejas de lograr el embarazo con los años.

### **1.3 . Efectos de las técnicas de reproducción asistida**

Pese al creciente éxito de las TRA, los resultados distan de ser óptimos, y el número de embarazos que se ven interrumpidos en fases tempranas o tardías de gestación sigue siendo superior a la de los embarazos concebidos naturalmente (Hu et al., 2018). Durante un tratamiento con TRAs, desde la estimulación ovárica, la recuperación de gametos, FIV o ICSI y el paso final de la transferencia del embrión (incluyendo de forma ocasional la biopsia embrionaria), las células se encuentran en condiciones ambientales diferentes a las de su medio natural, de manera que se genera una situación estresante que “parece” desencadenar cambios (Duranton y Chavatte-Palmer, 2018). Es por ello que los efectos y la inocuidad sobre los embriones son algunos puntos más cruciales en el desarrollo y la aplicación de las TRA (Simopoulou et al., 2018). Por ejemplo, los medios de cultivo en que se mantienen los embriones durante un tratamiento de TRA, y que trata de mimetizar el medio natural en el que se mantiene, afectan a su desarrollo, de modo que el uso de diferentes medios influye directamente en la capacidad de desarrollo y la tasa de implantación de los embriones (Ayres et al., 2002; Friedler et al., 2007). Estudios recientes demuestran que el medio de cultivo podría tener efectos en la salud y el desarrollo de humanos a largo plazo (Bouillon et al., 2016). La temperatura, la humedad, o la calidad del aire han sido también descritos como factores a tener en cuenta durante el cultivo de embriones *in vitro* (Simopoulou et al., 2018). La temperatura a la que los gametos y los embriones tempranos desarrollan su actividad metabólica es menor a la del resto del cuerpo, de modo que trabajar a temperaturas más altas podría tener efectos sobre el metabolismo embrionario temprano (Leese et al., 2008). Por otro lado, la concentración de oxígeno a la que se desarrollan los embriones *in vivo*, especialmente en el periodo preimplantacional, es menor a la concentración atmosférica, en la que el nivel de oxígeno es del 20% (Fischer y Bavister, 1993). Así, se ha observado que en embriones de ratón, el patrón de expresión génica en un ambiente con menor cantidad de oxígeno (5%) *in vitro* es más similar al patrón *in vivo* (Takahashi, 2012). Del mismo modo, altos niveles de oxígeno han sido relacionados directamente con la aparición de especies reactivas de oxígeno peligrosas para el

embrión (Takahashi, 2012). La exposición a la luz ha demostrado tener efectos negativos en el potencial de implantación de embriones de ratón, probablemente debido a daños en el ADN. El uso de un filtro óptico rojo parece reducir de forma significativa los efectos dañinos provocados por la luz blanca sobre el ADN y las capacidades de implantación (Bognar et al., 2019).

Por otro lado, las TRA que implican una manipulación directa de gametos y embriones, como la vitrificación, pueden provocar daños en los mismos debido al estrés al que se someten las células a causa de la brusca bajada de temperatura, de modo que se puede alterar la permeabilidad de membrana o dañar orgánulos, además de la formación de hielo por las grandes cantidades de agua presentes en las células, especialmente en ovocitos (Iussig et al., 2019). Para evitar los daños por la formación de cristales de hielo, se emplean crioprotectores, pero altas concentraciones de los mismos pueden tener efectos tóxicos sobre las células (Best, 2015). En el caso de embriones, se ha observado cómo la vitrificación reduce su viabilidad al aumentar la cantidad de blastómeros dañados en comparación con un embrión fresco (Oikonomou et al., 2017). La vitrificación no es la única técnica que puede causar daños, sino que otras como la capacitación de los espermatozoides mediante gradientes de densidad podría provocar daños en el ADN espermático (Albani et al., 2019), mientras que la fertilización mediante ICSI resulta invasiva para la célula, además de requerir una decumulación enzimática y mecánica previa, y una selección arbitraria del espermatozoide que puede afectar negativamente al desarrollo y maduración del embrión (Neri et al., 2015).

A nivel genético, las TRA no han demostrado provocar anomalías notables en el cariotipo de los embriones, aunque la cantidad de muestras analizadas y estudios realizados sigue siendo insuficiente como para obtener una conclusión estadística definitiva (Li et al., 2018). Uno de los aspectos más estudiados de las consecuencias de la aplicación de las TRA son las modificaciones epigenéticas provocadas sobre los embriones, destacando la metilación del ADN. La metilación del ADN es una modificación covalente consistente en la transferencia de un grupo metilo en la posición C5 de una citosina para formar 5-metilcitosina. La metilación es un sistema de regulación de la transcripción, de modo que el grupo metilo es capaz de reclutar proteínas que repriman la expresión génica o impedir la unión de los factores de transcripción (Moore et al., 2013). El patrón de metilación del ADN es diferente según el tipo celular, según el sexo del individuo o el ambiente. Además, es variable durante el desarrollo de un individuo, siendo sus primeras fases del desarrollo embrionario un punto clave en su formación. Tras la fertilización, en un estado de célula germinal primordial preimplantacional, la información epigenética, especialmente el patrón de metilación, es borrada a un estado basal, para ser restaurada más tarde, en el estadio de blastocisto (Canovas et al., 2017). Existen diversos factores que pueden alterar el patrón de metilación normal durante estas fases, y uno de ellos son las TRA. Existen estudios que sugieren que el manejo de embriones en medios de cultivo, su criopreservación, las técnicas de fecundación *in vitro* o ICSI pueden alterar el establecimiento y conservación de la impronta genética de los embriones (Hiura et al., 2014; Uyar y Seli, 2014). Estas alteraciones de impronta genética se han relacionado, en combinación con otros defectos en diferentes loci, con diversos desórdenes, como el síndrome de Beckwith-Wiedemann, el síndrome de Prader-Willi o el síndrome de Silver-Russel. También se asocian estas alteraciones con algunos fenotipos como diabetes, malformaciones del corazón o deficiencia mental, aunque la normalidad se suele

traducir en individuos sanos (Hattori et al., 2019). También se han relacionado con abortos espontáneos durante el primer y principios del segundo semestre de embarazo (Ono et al., 2006). Las ADN metiltransferasas (DNMTs) son las proteínas responsables de la regulación de la metilación del ADN y por tanto de diversas funciones como la inactivación del cromosoma X o el mantenimiento de la impronta genética. Un mal funcionamiento de DNMTs puede provocar la letalidad embrionaria, y la presencia de SNPs en los genes de estas proteínas podría provocar un perfil de metilación adverso para el desarrollo y causante de abortos espontáneos (Liu et al., 2017).

Recientemente, se están describiendo cuestiones epidemiológicas y patológicas tras la aplicación de TRA. Así, se ha descrito un aumento de hasta el 60% en casos de leucemia y linfoma de Hodgkin en niños nacidos entre 1984 y 2011 (Reigstad et al., 2016), además de un aumento en casos de malformaciones congénitas en poblaciones como Teherán (Farhangniya et al., 2013). También se ha asociado un incremento (1.71 veces) los casos de preeclampsia en mujeres nacidas mediante TRA (Almasi-hashiani et al., 2019). En ciertos estudios, además, se ha asociado el uso de las TRA con problemas cardiovasculares (Scherrer et al., 2015). No obstante, existen otros trabajos en los que no se han encontrado diferencias significativas entre hombres nacidos mediante TRA y concebidos naturalmente de la misma población en términos de problemas cardiovasculares, de crecimiento o respiratorios (Halliday et al., 2019). Otros defectos congénitos que se han asociado a las TRA son la tetralogía de Fallot o la hipospadia, las cuales se ven afectadas por la subfertilidad y los nacimientos múltiples. Estos dos hechos explican hasta el 36% del efecto relativo de las TRA sobre enfermedades congénitas no cromosómicas (Lieberman et al., 2018). Aunque en humanos es difícil determinar si estos efectos son realmente causados por los TRAs en sí mismos o se originan a partir de anomalías genéticas o factores de riesgo intrínsecos a los pacientes infértiles (Chen y Heilbronn, 2017), los modelos animales parecen demostrar que los procedimientos asociados con las TRA afectan al desarrollo a corto y largo plazo con efectos postnatales en los fenotipos resultantes (Duranthon y Chavatte-Palmer, 2018). Las modificaciones fenotípicas más observadas son aquellas que más preocupan a los profesionales, es decir, el peso al nacer y las trayectorias de crecimiento, la salud metabólica y los problemas cardiovasculares, como la presión arterial elevada, las alteraciones epigenéticas, la aparición de algunos defectos relacionados con el comportamiento y el desarrollo infantil (Bouillon et al., 2016).

Las TRA también han sido asociadas a cambios en los niveles de expresión génica de los embriones (Saenz-de-Juano et al., 2016), y estos cambios pueden estar relacionados con la calidad y supervivencia embrionaria (Cánepa et al., 2014). En concreto, los genes octamer-binding transcription factor (Oct4), NANOG homeobox (Nanog) y sex determining region Y-box 2 (Sox2) son factores de transcripción de gran importancia en la regulación y el mantenimiento de la pluripotencialidad en el estado embrionario (Chambers y Tomlinson, 2009), de modo que su correcta expresión se ha relacionado directamente con la calidad de los embriones (Gendelman y Roth, 2012; Mitsui et al., 2003; Zhang, 2014).

#### 1.4. La transferencia embrionaria

Los embriones resultantes tras un tratamiento de TRA han de ser transferidos a una receptora para su implantación y desarrollo en el útero materno, siendo este paso uno de los más críticos del proceso (ASRM, 2017). La transferencia se suele llevar a cabo durante los días 2-3 de división del embrión tras la fecundación o una vez alcanzado el estado de blastocisto en días 5-6, y aunque existe cierta controversia entre la comunidad en cuanto al momento óptimo para transferir un embrión, son diversos los estudios cuyos resultados apuntan a que el estado blastocisto proporciona mayores tasas de embarazos exitosos (Glujovsky et al., 2007). La transferencia de blastocistos parece dar mejores resultados por varias razones. En primer lugar, la exposición de embriones tempranos al útero puede ser fisiológicamente prematura, especialmente tras un tratamiento de superovulación y exposición a altos niveles de estrógenos (Valbuena et al., 2002). El embrión en concepción natural alcanza el útero en un estado de mórula (16 células), lo cual implica en humanos un día 4 de desarrollo *in vitro*. El útero proporciona un ambiente diferente al embrión al que proporciona el oviducto, lo cual provoca estrés en los embriones tempranos que puede traducirse en un descenso en las tasas de implantación (Gardner et al., 1998). En segundo lugar, permitir a los embriones madurar *in vitro* durante unos días más hasta alcanzar el estado de blastocisto provoca un efecto de autoselección tras la activación del genoma embrionario, de modo que es teóricamente posible seleccionar los embriones más viables para implantación mediante la identificación de aquellos capaces de alcanzar el estado de blastocisto (De Placido, 2002; MacHtinger y Racowsky, 2013).

Por otra parte, y a pesar de los avances en el desarrollo de medios de cultivo como las técnicas de co-cultivo o el cultivo secuencial, en que los embriones en día 3 son transferidos de un medio de baja concentración de glucosa y uno o más aminoácidos a uno de mayor concentración de glucosa y mayor rango de aminoácidos (Gardner et al., 1998), logrando aumentar la tasa de implantación en un 60%, los medios de cultivo para embriones *in vitro* no son capaces de replicar perfectamente las condiciones de desarrollo *in vivo* (Bouillon et al., 2016). De este modo, una desventaja teórica es que embriones que no llegan a alcanzar correctamente el estadio de blastocisto *in vitro* quizá podrían haberlo hecho *in vivo* de haberse transferido en una etapa más temprana de desarrollo (Sjöblom et al., 2006), aunque esto no está demostrado.

En producción animal, la transferencia embrionaria es considerada como una técnica de gran interés por tres grandes razones. La primera de ellas es un aumento notable en la cantidad de crías que una hembra puede engendrar en un tiempo mucho menor al de un ciclo reproductivo normal. En segundo lugar, la posibilidad de almacenamiento de los embriones para un posterior desarrollo (Bradford y Kennedy, 1980). En tercer lugar, la transferencia embrionaria supone un proceso de selección para la mejora genética de la descendencia, en aplicación junto con técnicas de ovulación múltiple. La variación vendría proporcionada por un menor intervalo de tiempo entre generaciones, un mayor grado de selección entre las hembras, o ambas. De este modo, el uso de transferencias embrionarias en programas de selección para estudiar la

variación genética entre generaciones de ovejas ofrece resultados de aumento en el ratio de variación de entre el 60 y 80% mayores que en las generaciones naturales (Smith, 1986). Asimismo, en un programa de selección en ganado vacuno para la tasa de crecimiento, se podría lograr un grado de respuesta sustancialmente mayor mediante la introducción de técnicas de superovulación y transferencia embrionaria que en un programa convencional (Land y Hill, 1975). Por otro lado, Pomp et al. (1989) encontraron evidencias en ratones de que el genotipo de la madre receptora tenía un importante impacto en la supervivencia y desarrollo de los embriones transferidos. Aquellos transferidos a una receptora de una línea de mayor tamaño alcanzaban un mayor peso corporal y una cola más larga que aquellos transferidos a una receptora de una línea de menor tamaño. Sin embargo, a pesar de las diferencias significativas en el peso corporal entre los genotipos de las receptoras, los factores relacionados con el peso corporal no se relacionaron con el efecto uterino sobre la supervivencia prenatal, mientras que se propuso que los mecanismos responsables de los efectos observados pueden operar en procesos de implantación y mortalidad post-implantación de camadas enteras, y podrían incluir perfiles hormonales maternos y fetales, flujo sanguíneo útero-placentario y otras interacciones materno-fetales (Pomp et al., 1989).



## **2. OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo final de grado es estudiar el efecto de la transferencia embrionaria sobre (i) la paternidad de la descendencia obtenida utilizando inseminación artificial con mezcla heterospérmica y (ii) la calidad embrionaria determinada mediante la expresión de mRNA de genes pluripotentes (OCT4, Sox2 y Nanog).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales

Los animales utilizados en este estudio fueron proporcionados por las granjas cunícolas de la Universitat Politècnica de València. En concreto, se trabajó con una línea de conejo sintética de la especie *Oryctolagus cuniculus* con origen California seleccionada por tamaño de camada (Figura 1). Todos los conejos empleados fueron alojados en jaulas individuales en condiciones ambientales controladas, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad diarias, temperatura media diaria de 17,5°C y máxima de 25,5°C. Los animales fueron alimentados con un pienso comercial y disponían de acceso a agua filtrada de forma libre. El manejo animal se produjo de acuerdo con los procedimientos aprobados por la Generalitat Valenciana para la instalación cunícola número ES462500001091 y procedimientos con número de registro 250V091. También han sido aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Politècnica de València (código 2018/VSC/PEA/0116), en conformidad con la Directiva 2010/63 de la normativa europea sobre experimentación con animales, y atendiendo a la legislación sobre experimentación animal del Real Decreto 53/2013 (BOE, 2013).



Figura 1. Fotografía de conejos de la UPV con origen California.

#### 3.2. Obtención de embriones

Los conejos seleccionados se dividieron en tres grupos, un primer grupo de 9 hembras nulíparas superovuladas donantes, un segundo grupo de 10 hembras multíparas receptoras y un tercer grupo de 7 hembras nulíparas superovuladas control.

### 3.2.1. Tratamiento de superovulación

Para el tratamiento de superovulación se empleó una hormona corifolitropina alfa recombinante comercial (rFSH-CTP; Elonva) (Merck Sharp y Dohme, SA, Kenilworth, NJ, EEUU), administrando de manera subcutánea una dosis de 0,75 µg por cada kg de peso (Viudes-de-Castro et al., 2019).

### 3.2.2. Inseminación de las hembras

Tras 72 horas del tratamiento de superovulación, se procedió a la inseminación heterospérmica de todas las hembras. Para ello, se extrajo un eyaculado de los cuatro machos que participaron en el experimento mediante el empleo de una vagina artificial siguiendo el método descrito por Vicente et al. (2011). Se utilizó una alícuota de cada eyaculado para realizar un análisis de las características macroscópicas y microscópicas del semen según los criterios descritos por Marco-Jiménez et al. (2010). Para llevar a cabo el espermiograma se realizó un análisis macroscópico (color y volumen) y microscópico (motilidad, concentración y morfoanomalías) para, por un lado determinar la calidad de los eyaculados, y por otro ajustar la concentración de espermatozoides de cada uno de los machos a 4 millones (dosis total de 16 millones). Para llevar a cabo la valoración microscópica se obtuvo una muestra diluida (1:20) con una solución Tris-Cítrico-Glucosa determinando la motilidad y viabilidad, y otra muestra diluida (1:20) con una solución de glutaraldehído (0.25%) para las determinaciones de la concentración y morfoanomalías.

#### Motilidad

La motilidad se determinó mediante un sistema computarizado de motilidad espermática (ISAS). Para ello se empleó una cámara Makler en un microscopio de contraste de fase negativa con una platina atemperada (37°C). Los parámetros determinados fueron:

- Velocidad curvilínea (VCL) (µm/s): es la velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática. La distancia total que la cabeza del espermatozoide cubre en el período de observación. Es siempre el mayor de los tres parámetros de velocidad (VCL, VAP, VSL).
- Velocidad media (VAP) (µm/s): velocidad media del recorrido del espermatozoide. Es la distancia que el espermatozoide ha recorrido en su trayectoria durante el período de observación.
- Velocidad rectilínea (VSL) (µm/s): distancia en línea recta entre el primero y el último punto de la trayectoria recorrida. Resulta en el espacio recorrido por el espermatozoide en el período de observación.
- Índice de rectitud (STR) (%): estima la proximidad del recorrido seguido por los espermatozoides a una línea recta. Se calcula como el cociente entre la VSL y VAP, cuyo resultado se multiplica por 100.  $(VSL/VAP) \times 100$ .
- Índice de linealidad (LIN) (%): estima la proximidad de las trayectorias de los espermatozoides a una línea recta. Es el cociente entre VSL y VCL, cuyo resultado se multiplica por 100.  $(VSL/VCL) \times 100$ .

- Índice de oscilación (WOB) (%): estima la relación entre la trayectoria recorrida por el espermatozoide y la oscilación de la cabeza espermática. Se calcula como el cociente entre VAP y VCL, cuyo resultado se multiplica por 100.  $(VAP/VCL) \times 100$ .
- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH): es el desplazamiento medio realizado por la cabeza del espermatozoide en su recorrido curvilíneo de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
- Frecuencia de batido de la cabeza (BCF) (Hz): frecuencia con que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal media en función del tiempo.

### Concentración espermática

La concentración espermática fue determinada mediante el empleo de una cámara cuentaglobos Thoma-Zeiss (Marienfeld, Alemania. Figura 2).



Figura 2. Cámara Thoma-Zeiss empleada para determinar la concentración espermática.

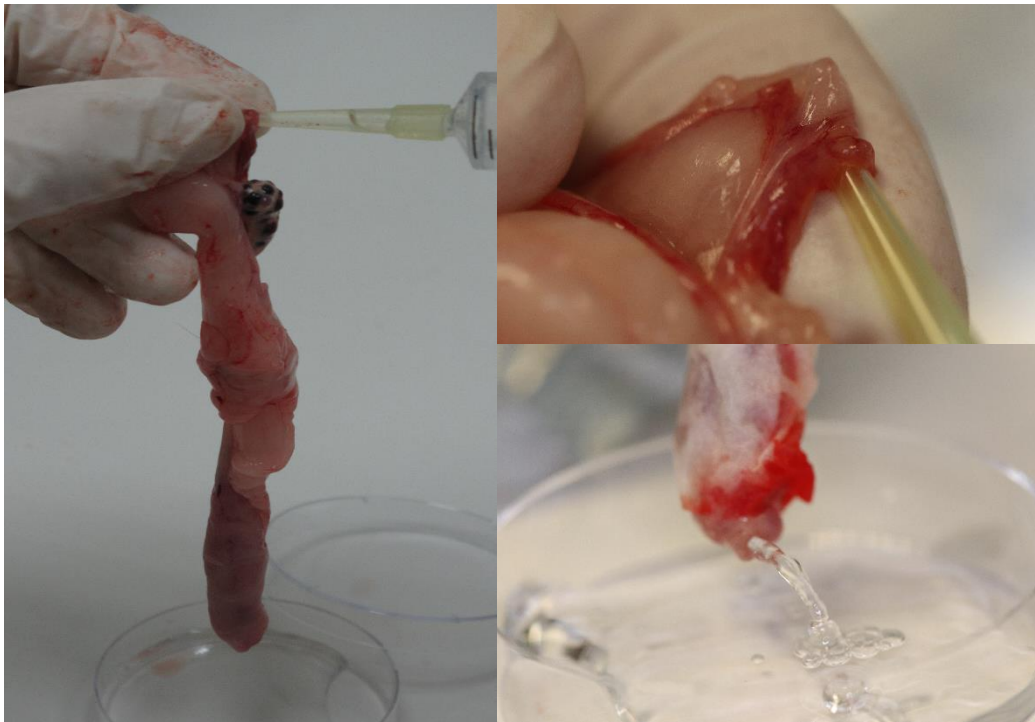
### Morfología espermática

La valoración morfológica se determinó a 400 aumentos mediante microscopía de contraste de fases, evaluando el porcentaje de espermatozoides anormales (cabeza, pieza intermedia y cola) en cada una de las muestras.

Tras la preparación de la dosis con una concentración de 16 millones (4 millones/macho), la inseminación vaginal se realizó mediante el uso de una cánula. Tras depositar la dosis en el fondo de la vagina, la inducción de la ovulación se realizó mediante una inyección intramuscular de 1  $\mu\text{g}$  de acetato de buserelina (Suprefact; Hoechst Marion Roussel, Höchst, Alemania), un análogo sintético de la GnRH.

### 3.2.3. Recuperación de embriones de donante y transferencia a hembras receptoras.

24 horas después de la inseminación, las hembras superovuladas fueron eutanasiadas mediante la administración de un tiobarbitúrico, obteniendo el tracto reproductivo y trasladándolo al laboratorio donde se procesaron a temperatura ambiente. Para ello se hizo una perfusión de oviducto y útero (Figura 3) con 10 mL de tampón fosfato alcalino (DPBS, Dulbecco's phosphate buffer serum) suplementado con 0,2% (v/w) de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, St. Luis, MO, EEUU) 0,132 g/L de  $\text{CaCl}_2$  y antibiótico (Penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaica 700.000 UI y sulfato de dihidrostreptomicina 1250 mg/L, Penivet, DIvasa Farmavic, Barcelona, España) para recuperar los embriones (Figura 4).

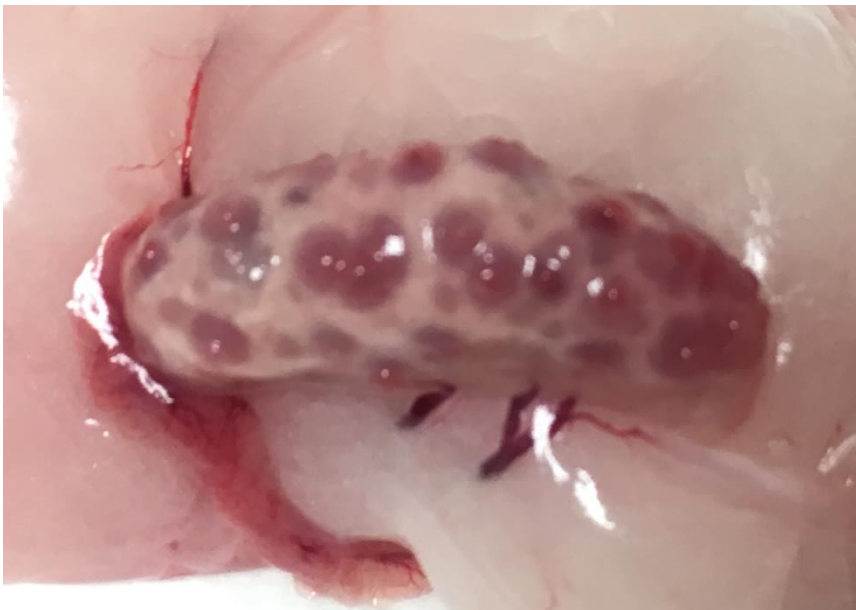


*Figura 3.* Fotografías del proceso de perfundir el tracto reproductivo.



*Figura 4.* Embriones recuperados a las 24 horas en estado de pronúcleos.

Se llevó a cabo el recuento de embriones y se obtuvo la tasa de recuperación (TR). También se obtuvo la tasa de ovulación (TO) mediante el recuento de cuerpos lúteos presentes en ambos ovarios (Figura 5), obteniéndose también el peso de los mismos.



*Figura 5.* Ovario de hembra de conejo superovulada extraído a las 24 horas de inducir la ovulación en la que se pueden apreciar los cuerpos lúteos empleados para obtener la TO.

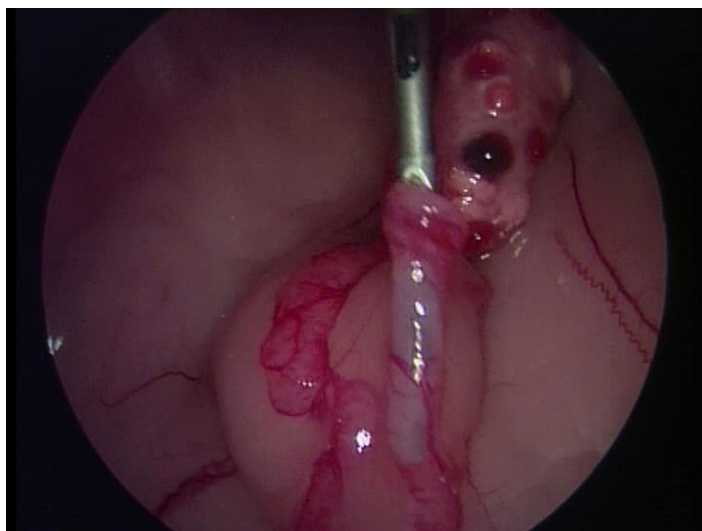
Tras la recuperación de los embriones se llevó a cabo la transferencia embrionaria vía oviductal a hembras receptoras. Se realizaron tres sesiones con un total de 418 embriones, distribuidos en 103, 231 y 84 en la primera, segunda y tercera sesión, respectivamente. La

trasferencia embrionaria se llevó a cabo acorde a la metodología descrita por García-Domínguez et al. (2019). Brevemente, la transferencia embrionaria se llevó a cabo mediante una laparoscopia. Para ello, se rasuró el abdomen de las conejas receptoras y se mantuvieron sedadas mediante una inyección intramuscular de 16 mg de xylazina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) seguida de otra inyección intravenosa de 16-20 mg de ketamina hidrociorada (Imalgène, Merial S.A., Lyon, France). Para llevar a cabo la transferencia se colocaron las hembras receptoras sobre una mesa de operaciones con una inclinación de 45° en posición cabeza abajo. Se le introdujo CO<sub>2</sub> en la cavidad abdominal con una aguja de Verres para distender el abdomen y facilitar el acceso del trócar y el endoscopio. Una vez distendido, se retiró la aguja de Verres y se le instaló un trócar de 5 mm para introducir el laparoscopio (Figura 6). Mediante la observación laparoscópica se introdujo una aguja epidural cerca de los ovarios a través de la región inguinal, se retiró el fiador y se introdujo el catéter contenedor de los embriones a transferir en uno de los oviductos. Los embriones fueron depositados en la zona ampular del oviducto. El proceso fue repetido para el segundo oviducto operando en el otro lado de la hembra (Figura 7).



*Figura 6.* Fotografía del proceso de transferencia mediante laparoscopia.





*Figura 7.* Deposición de los embriones en el oviducto mediante laparoscopia.

#### **3.2.4. Recuperación de blastocistos en día 6**

Pasados 6 días desde la inseminación, se realizó la recuperación de los embriones tanto de las hembras receptoras de los embriones superovuladas, como de las hembras control (Figura 8). El procedimiento empleado es el descrito anteriormente para los embriones de 24 horas, pero en este caso la perfusión completa del útero.

Los embriones recuperados en la primera y segunda sesión fueron tratados individualmente, almacenándolos en 10  $\mu$ L de tampón de lisis (15 mg/ml de proteinasa K, 100mM Tris-HCl (pH 8.3), 100mM KCl, 0.02% gelatina, 0.45% Tween 20 y 60 mg/ml yeast tRNA (Ambionn, Sakurai et al., 2014). Parte de los embriones de la segunda sesión y todos los obtenidos en la tercera sesión fueron almacenados en grupos de 8-10 para el análisis de mRNA.



*Figura 8.* Blastocistos de conejo recuperados a día 6.

Tal y como se describió anteriormente, los ovarios de las hembras control fueron igualmente recuperados para determinar la TO y el peso.



### **3.3. Análisis de parentesco**

#### **3.3.1. Extracción del ADN**

Para el establecimiento de parentesco entre los embriones y uno de los cuatro machos seleccionados para la mezcla heterospérmica se realizó un estudio de genotipado mediante microsatélites. La extracción y purificación del ADN se realizó, con 0,5 ml de sangre, con un kit comercial (Molecular Biology EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit, BioBasic, Markham, On, Canadá) siguiendo el protocolo recomendado, excepto que se emplearon 50 µl de proteinasa K y que esta se dejó actuar durante una incubación de 2 horas a 50°C. La calidad de la extracción se determinó mediante la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 260 nm empleando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, EEUU). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C para su uso posterior.

Las muestras de sangre se obtuvieron a los 3 meses de edad, bajo sedación mediante la administración intramuscular de una mezcla de xilacina y ketamina. Para ello se extrajo la sangre de la arteria central de la oreja mediante un catéter G22 (Intran Certo G22 0,9x25 mm) en un tubo con EDTA para evitar su coagulación.

Tras la extracción del ADN, se comprobó la concentración y la calidad de las muestras mediante la medida de absorbancia de las mismas a una longitud de onda 260 nm con un equipo de espectrofotometría Nanodrop 2000 de la empresa *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, Ma, EEUU). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

Se seleccionaron 3 hembras control superovuladas y tres hembras donantes para el análisis de parentesco. Para extraer el ADN de los embriones depositados en el tampón de descrito anteriormente se realizó una disrupción celular mediante un proceso de homogeneización por congelación con nitrógeno líquido (2 repeticiones) y posteriormente se añadió 400 µg/ml de proteinasa K y se incubó durante 60 minutos a 65°C, seguido de otra etapa de 10 minutos a 95°C (Sakurai et al., 2014). Además, se utilizó el kit comercial "*Molecular Biology Kit EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (Blood)*" de la empresa *BioBasic* (Markham, On, Canadá), adaptando el protocolo tras la incubación de la muestra en proteinasa K, para obtener una muestra más limpia de ADN y mejorar la calidad de los resultados. Se emplearon 15 embriones por cada hembra control utilizada y 11-23 embriones transferidos para establecer las relaciones de parentesco.

#### **3.3.2. Amplificación del ADN mediante PCR y secuenciación de los microsatélites**

El ADN de los parentales y la descendencia se analizó mediante genotipado empleando microsatélites seleccionados. Para ello, el ADN de todas las muestras se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores correspondientes a los microsatélites (Tabla 1). Para llevar a cabo la amplificación se empleó una solución *Taq* PCR Master Mix de la empresa Qiagen (Venlo,

Holanda) que contiene todo lo necesario para llevar a cabo la reacción. El proceso se llevó a cabo en una máquina GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster city, CA, EEUU). El programa de tiempos y las condiciones requeridas para cada cebador se recogen en la tabla 2.

Tabla 1. Datos bibliográficos sobre los microsatélites empleados.

Nombre	Secuencia cebadores (5'-3')	Tamaño amplificado	Nº accesión	Referencia bibliográfica
INRACDDV0137	Fw: TACATTGAAAGGAAGCGAAGG	239-247	AJ874477	Chantry-Darmon et al., 2005
	Rv: ATGGACGACATTTGTCCCATA			
INRACDDV0036	Fw: CGCACAGACTCAACATCCAG	175-183	AJ87398	
	Rv: CCCTACAGGCAGAGGCTTAAT			
INRACDDV0157	Fw: AACACTTGCCCTCTTTTCAT	118-124	AJ874497	
	Rv: CAGGTTGTGGGAGTCTTGTC			
INRACDDV0087	Fw: GATCTGGGACTCCAGAGTGTC	190-214	AJ874430	
	Rv: GAACACCGGTCTGGATGG			
INRACDDV0035	Fw: AACCACCAGGGTCAGCTTC	170-194	AJ87397	
	Rv: AGAGTGAGCGAGCGAGAGAC			

Tabla 2. Condiciones de amplificación para los diferentes microsatélites.

Proceso	T (°C)	Intervalos de tiempo				
		Mix137	Mix36	Mix157	Mix87	Mix35
Activación ADN polimerasa	94	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min
Desnaturalización	95	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s
Hibridación	60	60 s	60 s	30 s	30 s	30 s
Extensión	72	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s
Elongación final	72	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min

Posteriormente, las muestras amplificadas fueron sometidas a un proceso de secuenciación de los microsatélites de interés en un secuenciador CEQ 8000 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) mediante electroforesis capilar con marcaje de fluorescencia siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

### 3.3.3. Establecimiento de parentescos de la descendencia

Tras la secuenciación, se llevó a cabo el estudio del perfil de picos (figura 9) de los parentales para poder establecer el genotipo y, de este modo, establecer los alelos presentes en la población para los loci de interés. A continuación, se llevó a cabo la secuenciación del ADN proveniente de los blastocistos del grupo control y transferidos para conocer su genotipo y se realizó un estudio para determinar el parentesco de los mismos mediante el programa informático de asignación de paternidades Cervus (Field Genetics, London, Reino Unido).

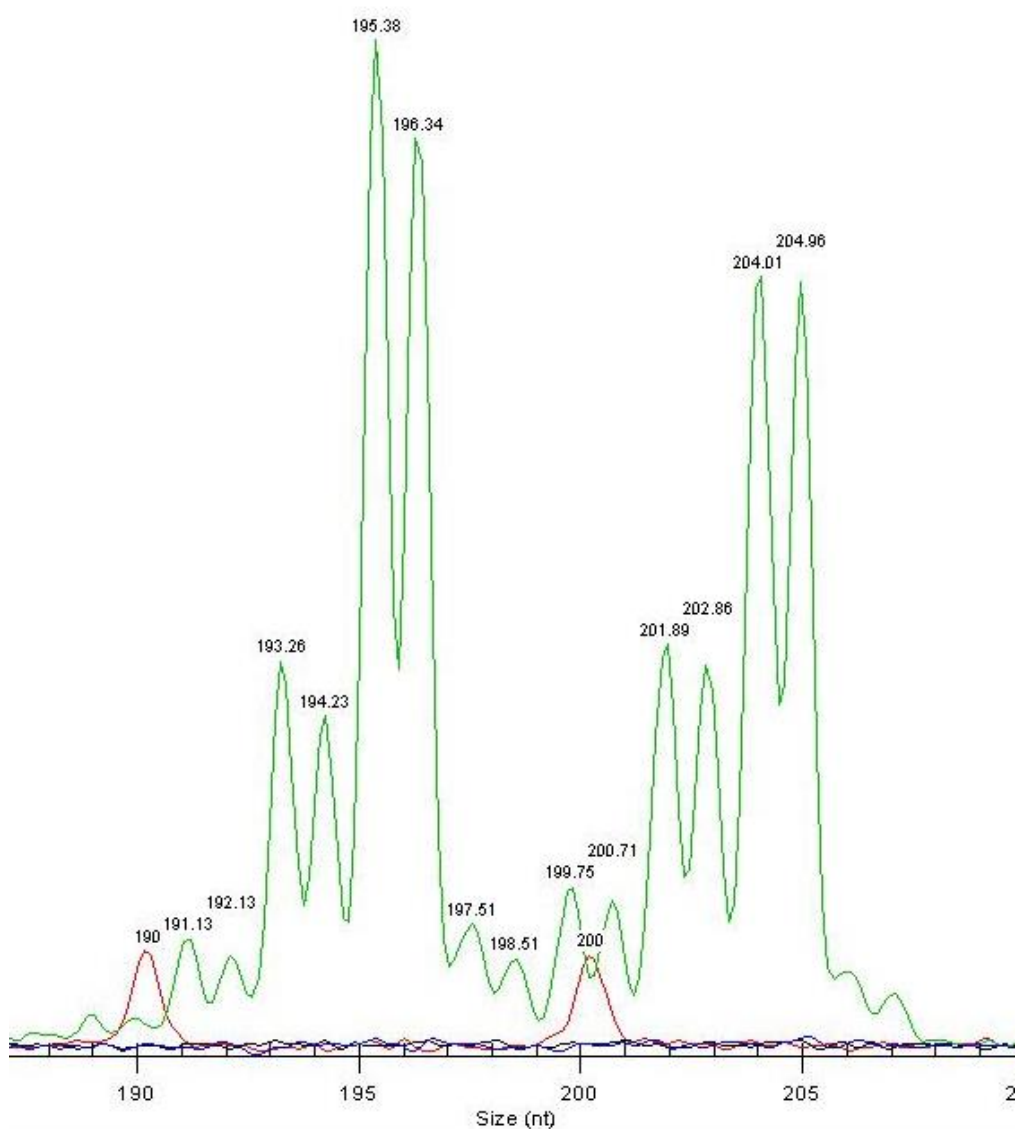


Figura 9. Ejemplo de perfil heterocigoto obtenido para el microsatélite INRACDDV0087.

### 3.4. Análisis de la expresión génica para genes de pluripotencialidad

#### 3.4.1. Extracción del ARNm de las muestras y retrotranscripción

Algunos de los embriones recuperados de la segunda y tercera extracción fueron destinados a un análisis de expresión génica. Para ello, se realizó una extracción del ARNm de los blastocistos. Sin embargo, y debido a la sensibilidad del mismo, la extracción se realizó en 6 grupos de 8-10 embriones y no individualmente, con el objetivo de obtener una mayor cantidad y calidad de la molécula. Para la extracción se empleó el kit comercial RNeasy® Plus Mini Kit de la empresa Qiagen (Venlo, Holanda) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue almacenado a una temperatura de -80°C.

Se realizó, posteriormente, un tratamiento con enzimas DNasas (Roche, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar posibles restos de ADN, y se verificó la concentración y la integridad de ARNm con un equipo de espectrofotometría Nanodrop 2000 de la empresa *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, Ma, EEUU). El ADNc se obtuvo a partir de la muestra de ARNm empleando el qScript™ Synthesis Kit (*Quanta Biosciences*™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para poder llevar a cabo la amplificación a tiempo real se diluyeron todas las muestras para que la concentración de todas ellas fuese la misma (500 ng), y así poder compararlas entre ellas. Para ello se realizó una dilución con la cantidad de ARNm necesaria para obtener 500 ng de material génico y agua libre de DNasas (*Sigma-Aldrich*, Alemania) hasta un volumen de 15 µL. La dilución fue introducida en el 2070 Thermal Cycler (*Applied Biosystems*) en las condiciones especificadas en la tabla 3. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su empleo en el análisis de expresión génica.

Tabla 3. Programa de tiempos empleados durante la retrotranscripción.

	Tiempo	T (°C)
Extensión cebadores	5 min	22
Síntesis ADNc	30 min	42
Final reacción	5 min	85

#### 3.4.2. Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR)

Para llevar a cabo la cuantificación relativa de los genes objeto para este estudio se llevó a cabo un reacción en cadena de la Polimerasa a tiempo Real (RT qPCR) empleando un termociclador *LightCycler*® 96 System (*Roche*, Suiza) y la enzima *SYBR*® Green como sistema de detección.

Los genes seleccionados para el estudio de expresión génica fueron los genes de pluripotencialidad *OCT4*, *Sox2* y *Nanog*. Asimismo, se empleó el gen de referencia *Housekeeping*

de la histona H2AFZ junto a un calibrador para ajustar las variaciones del ensayo y llevar a cabo la normalización de la expresión. La tabla 4 recoge información relevante acerca de los cebadores empleados en la amplificación de cada gen de interés

Tabla 4. Información bibliográfica sobre los genes empleados para el análisis génico.

Nombre	Secuencia cebadores (5'-3')	Tamaño amplificado	Nº accesión	Referencia bibliográfica
OCT4	Fw: CGAGTGAGAGGCAACTTGG	125 pb	NM_001099957	Mamo et al., 2008
	Rv: CGGTTACAGAACCACACACG			
Sox2	Fw: AGCATGATGCAGGAGCAG	270 pb	NM_003106	Wang et al., 2007
	Rv: GGAGTGGGAGGAAGAGGT			
Nanog	Fw: CCAGGTGCCTTTACAGACA	104 pb	ENSOCUT 00000013777	Alberola, 2018
	Rv: TCACTACTCTGGGACTGGGA			
H2AFZ	Fw: AGAGCCGGCTGCCAGTTCC	85 pb	AF030235	Mamo et al., 2008
	Rv: CAGTCGCGCCACACGTCC			

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos con un volumen final por reacción de 10  $\mu$ L. Se emplearon 5  $\mu$ L de una 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). Se añadió 1  $\mu$ L de cada cebador necesario para la amplificación y 3  $\mu$ L del cDNA retrotranscrito en una dilución 1:20. La tabla 5 recoge el programa de tiempos empleados en la amplificación a tiempo real.

Tabla 5. Programa empleado para la amplificación a tiempo real.

		Tiempo	T (°C)
Preincubación		10 min	95
Amplificación	40 ciclos	1 s	95
		30 s	60
Melting		10 s	95
		60 s	65
		1 s	97
Enfriamiento		30 s	37

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 (Roche, 2001) (Ecuación 1).

$$\text{Ratio } N = E f_{\text{target}}^{(Ct \text{ calibrador} - Ct \text{ muestra})} \cdot E f_{\text{Housekeeping}}^{(Ct \text{ muestra} - Ct \text{ calibrador})} \quad (\text{Ec. 1})$$

### 3.5. Análisis estadístico

Para evaluar si la transferencia afectaba a la tasa de recuperación embrionaria en día 6 con respecto al grupo control, así como para el análisis de parentescos, se llevó a cabo un análisis mediante un test *chi-cuadrado* con la corrección de *Yate's*. Para evaluar los parámetros de calidad espermática se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el macho como factor fijo (4 niveles). Para evaluar el efecto de la transferencia embrionaria sobre el ratio de expresión génica de los genes de pluripotencialidad seleccionados se utilizó un ANOVA que incluía como factor fijo el grupo experimental (control y transferencias). Se realizó un test de normalidad sobre los datos de expresión génica, normalizando los datos de la expresión de los genes objeto de este estudio (Sox2, Oct4 y Nanog) mediante una transformación angular. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software IBM SPSS Statistics Subscription Trial (SPSS Inc; Chicago, Illinois, USA, 2002) considerando como datos significativos aquellos con un P-value < 0,05.

### 3.6. Diseño experimental

Para una mejor comprensión del diseño experimental del estudio se muestra un esquema del mismo (Figura 10).

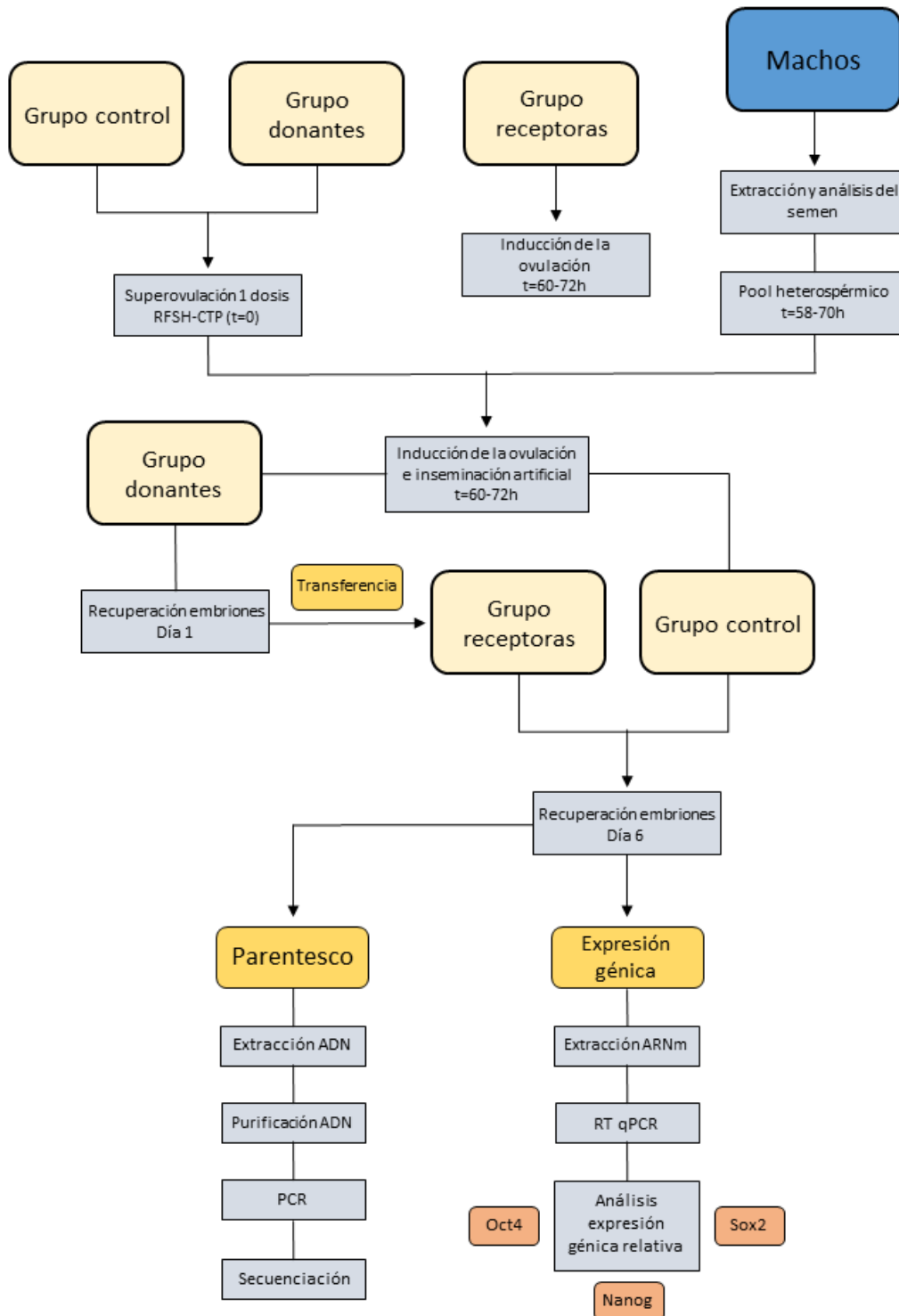


Figura 10. Esquema del diseño experimental.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Recuperación de embriones

La recuperación de los blastocistos se llevó a cabo 6 días después de la inseminación inicial de las hembras donantes y superovuladas. El número de embriones control recuperados fue de 300, frente a una tasa de ovulación de 365. Por otro lado, la cantidad de embriones transferidos en día 1 fue de 304, mientras que la cantidad de blastocistos recuperados de las hembras receptoras fue de 158. Esto supone una tasa de supervivencia embrionaria del 82,19% en el caso de los controles y un 51,97% de los embriones transferidos (Figura 11), siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

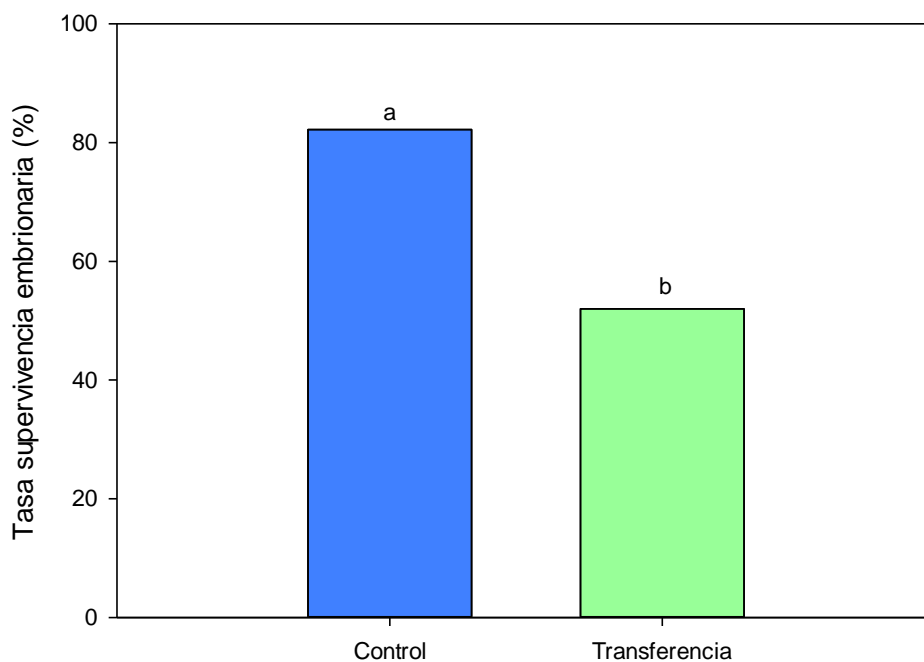


Figura 11. Tasa de supervivencia de los embriones transferidos y control expresada en porcentaje.

### 4.2. Análisis de la calidad espermática

El análisis estadístico de los parámetros de calidad espermática no mostró diferencias significativas entre los distintos machos para ninguno de los parámetros evaluados ( $P$ -value > 0,05). Los valores medios para cada parámetro y macho se muestran en la tabla 6.



Tabla 6. Valores obtenidos para los parámetros de calidad espermática evaluados. Valores expresados como media  $\pm$  error típico.

Parámetro	Macho				P-value
	A	B	C	D	
Motilidad (%)	88,8 $\pm$ 3,74	81,9 $\pm$ 3,74	91,3 $\pm$ 3,74	87,2 $\pm$ 3,74	0,398
Morfoanomalías (%)	10,2 $\pm$ 3,35	12,5 $\pm$ 3,35	11,4 $\pm$ 3,35	9,9 $\pm$ 4,11	0,947
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	82,4 $\pm$ 6,66	87,7 $\pm$ 6,66	97,6 $\pm$ 6,66	99,1 $\pm$ 6,66	0,301
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	51,5 $\pm$ 5,10	41,8 $\pm$ 5,10	42,9 $\pm$ 5,10	41,7 $\pm$ 5,10	0,505
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	57,1 $\pm$ 4,63	59,2 $\pm$ 4,63	65,0 $\pm$ 4,63	64,7 $\pm$ 4,63	0,558
LIN (%)	50,8 $\pm$ 6,18	48,4 $\pm$ 6,18	44,5 $\pm$ 6,18	42,4 $\pm$ 6,18	0,773
STR (%)	72,3 $\pm$ 4,41	70,4 $\pm$ 4,41	66,2 $\pm$ 4,41	64,8 $\pm$ 4,41	0,618
WOB (%)	69,5 $\pm$ 4,82	68,1 $\pm$ 4,82	66,9 $\pm$ 4,82	65,4 $\pm$ 4,82	0,938
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2,7 $\pm$ 0,29	3,1 $\pm$ 0,29	3,2 $\pm$ 0,29	3,0 $\pm$ 0,29	0,712
BCF (Hz)	8,7 $\pm$ 0,46	8,7 $\pm$ 0,46	9,1 $\pm$ 0,46	8,1 $\pm$ 0,46	0,520

### 4.3. Análisis de parentesco

Para llevar a cabo el análisis genotípico de la descendencia y establecer el parentesco de los diferentes embriones se emplearon 5 microsatélites (Tabla 1). Sin embargo, finalmente sólo se analizaron 4 microsatélites de la descendencia, debido a que los cuatro parentales presentaron un genotipo idéntico para el microsatélite INRACDDV0137, de modo que no aportaba información relevante en la asignación de paternidades. El genotipo de los parentales para los microsatélites estudiados se recoge en la tabla 6.

Tabla 7. Genotipo de los diferentes parentales para los microsatélites estudiados.

Macho	0137 (239-247)		0036 (175-183)		0157 (118-124)		0087 (190-214)		0035 (170-208)	
A	240	246	183	183	121	121	196	206	170	194
B	240	246	176	181	119	119	205	205	170	190
C	240	246	176	181	119	121	196	196	190	190
D	240	246	181	181	119	123	205	205	170	194
Alelos en la población	240, 246, 249		176, 181, 183		119, 121, 123		196, 200, 205		170, 190, 194	

El análisis de parentesco se llevó a cabo sobre 70 embriones y se logró un 100% de asignación de la paternidad sobre los mismos. Se observaron valores similares en el número de descendientes asignados a cada parental, de modo que no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de embriones transferidos frente al grupo control. Sin embargo, sí se observó un mayor número de descendientes asociados a dos de los parentales. Se asignaron el 42,9% y el 35,7% a los parentales C y D, respectivamente, mientras que a los individuos A y B se les asignó el 11,4% y el 10% (Figura 12).

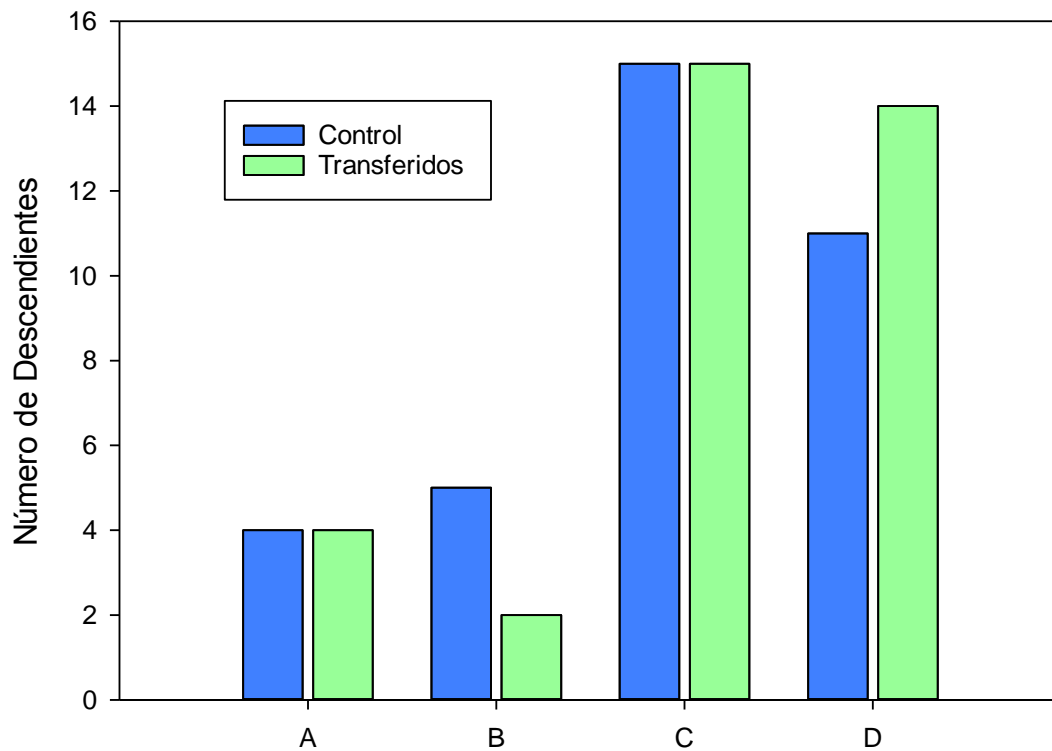


Figura 12. Número de descendientes asignados a cada parental.

#### 4.4. Análisis expresión génica

El estudio de los niveles de expresión génica de los genes de pluripotencia Sox2, Oct4 y Nanog se llevó a cabo sobre 6 muestras de embriones transferidos y 5 muestras de embriones control. Los resultados muestran diferencias significativas en los niveles de expresión de Sox2, observando una menor expresión para los embriones transferidos ( $0,52 \pm 0,249$  vs  $2,97 \pm 1,246$  para transferidos vs control, respectivamente.  $P < 0.05$ ). En cuanto a los niveles de expresión de Oct4 y Nanog, estos fueron similares para ambos grupos experimentales  $0,97 \pm 0,262$  vs  $1,61 \pm 0,986$ , para OCT4 y  $1,53 \pm 0,437$  vs  $2,11 \pm 0,928$ , para Nanog, para transferidos vs control, respectivamente. ( $P < 0.05$ ) (Figura 13).

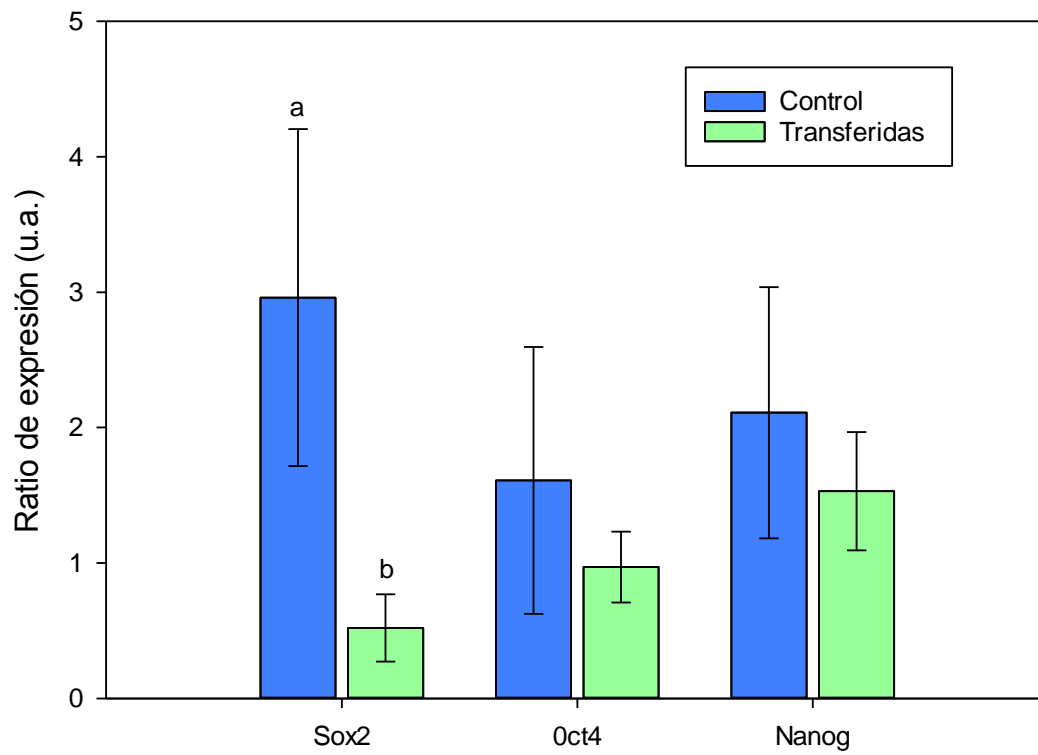


Figura 13. Ratio de expresión de los genes de pluripotencia en embriones control y transferidos.

## 5. DISCUSIÓN

Debido a la importancia de la transferencia embrionaria durante un ciclo de TRA (técnica imprescindible en cualquier tratamiento reproductivo) y la falta de estudios sobre los efectos de este procedimiento (Saenz-de-Juano et al., 2016; Luna et al., 2007), este trabajo se ha enfocado en evaluar las consecuencias de esta técnica sobre la paternidad de la descendencia mediante inseminación artificial con mezcla heterospérmica y sobre la calidad embrionaria. Nuestros resultados demuestran que manipular a los embriones de 24 horas (lavado oviductal, manipulación *in vitro* y transferencia a una hembra receptora) afecta al número de embriones recuperados y a la expresión del gen Sox2, pero no afecta a la paternidad de la descendencia.

Este estudio confirma que las TRA no parecen inocuas (Hu et al., 2018). Así, el uso de la transferencia embrionaria ha sido asociada con una reducción de la supervivencia embrionaria, asociando este efecto a alteraciones en genes relacionados con la implantación, el desarrollo placentario y pérdidas gestacionales tempranas (Saenz-de-Juano et al., 2016). Los resultados de Luna et al. (2007) demuestran que el cultivo *in vitro* de embriones y su posterior transferencia para obtener descendencia genera un desequilibrio significativo en la proporción de sexos. En cambio, nuestros resultados demuestran que la técnica de transferencia embrionaria no altera la contribución de cada uno de los machos a la descendencia. Es conocido que la activación del genoma embrionario es estadio-especie dependiente (Lee et al., 2014), ocurriendo en varios mamíferos en el estadios de 2 células (Jansz y Torres-Padilla, 2019). Por ello, es posible que en un estadio de pronúcleos, momento en el que se realizó la transferencia en este estudio, no se causase ningún efecto sobre la descendencia y, por tanto, no se observaran variaciones en los patrones de parentesco. No obstante sería necesario realizar un nuevo estudio en el que se comparasen transferencias en diferentes estadios.

Sin embargo, en este estudio se observa un efecto de dominancia entre machos con similares características seminales. Este efecto de dominancia, basado en inseminación heterospérmica, ha sido descrito en varias especies (Vicente et al., 2004; Puglisi et al. 2012). Concretamente, Ferreira et al. (2014), observaba un rendimiento reproductivo similar en 4 verracos mediante IA homospérmica, pero un número de descendientes significativamente diferente mediante inseminación heterospérmica. Nuestros resultados confirman los resultados obtenidos anteriormente en conejo por Vicente et al. (2004), pero con un macho más en la mezcla heterospérmica. Nuestros resultados vuelven a resaltar que los parámetros seminales determinados en un espermiograma convencional; motilidad y morfoanomalías, permiten descartar machos de reducida fertilidad pero son insuficientes para explicar la fertilidad (Ferreira et al., 2014). Han sido diferentes los factores maternos descritos en la bibliografía que pueden influir en el transporte selectivo de los espermatozoides por el tracto reproductivo de la hembra que provocan cambios en el tiempo de la primera división embrionaria (Nicol y McLaren, 1974) o diferencias en el tiempo de capacitación de los espermatozoides debido al tiempo de ovulación (Parrish y Foote, 1985), así como una interacción diferente entre proteínas maternas y paternas en el tracto reproductivo (Hernández-Silva y Chirinos, 2019).

Cuando se evaluó el efecto de la transferencia embrionaria sobre la calidad embrionaria, los resultados revelaron una sub-expresión del gen Sox2. La expresión del gen Sox2 junto con

los genes Oct4 y Nanog han sido descritos como importantes factores de transcripción marcadores de pluripotencia embrionaria (Chambers y Tomlinson, 2009). Específicamente, en ratón se ha demostrado que Sox2 es un factor de transcripción de gran importancia en el mantenimiento de la pluripotencialidad debido especialmente a su interacción y mantenimiento de la expresión de Oct4 (Masui et al., 2007). En bovino, se ha demostrado que su expresión en la masa celular interna juega un papel esencial en la formación del blastocisto, y su delección tiene efectos negativos en el desarrollo del mismo (Goisis y Cibelli, 2014). Estos estudios en distintas especies sugieren que, a pesar de que Sox2 no ha sido estudiado en profundidad en conejo, su expresión diferencial en los embriones transferidos podría estar relacionada con una disminución de la tasa de supervivencia. Por otro lado, y a diferencia de este estudio, Saenz-de-Juano et al. (2016) sí observaron un descenso significativo en la expresión de Oct4 en embriones transferidos. Oct4 es un factor de transcripción regulador de la pluripotencia encargado de activar o reprimir varios genes diana involucrados en muchos casos en la diferenciación celular y el desarrollo embrionario temprano (Foygel et al., 2008; Smith et al., 2007), y una alteración en sus patrones de expresión en embriones preimplantacionales se ha asociado a embriones de peor calidad (Gendelman y Roth, 2012). Esta diferencia en los resultados entre los dos estudios para Oct4 podría estar relacionada con la edad a la que el embrión fue manipulado para llevar a cabo la transferencia. Saenz-de-Juano et al. (2016) recuperaron y transfirieron los embriones en estadio de morula tardía – blastocisto temprano (72 horas), mientras que en este estudio la transferencia se llevó a cabo en estadio de pronúcleos – 2 células (24 horas). Saenz-de-Juano et al. (2014) demuestran que la vitrificación y la transferencia embrionaria en día 3 no provocan cambios en los niveles de metilación y la expresión génica de Oct4. No obstante, debido a los importantes mecanismos que regulan y modifican los patrones de metilación durante los primeros días de desarrollo en embriones preimplantacionales (Canovas et al., 2017), no es posible afirmar que el patrón de metilación de un embrión en estadio de pronúcleos sea equivalente al de una morula tardía - blastocisto temprano, y por tanto la regulación de la transcripción génica sea distinta (Moore et al., 2013). Así, diferencias en los niveles de expresión de Oct4 en embriones preimplantacionales de conejo en función del desarrollo han sido descritos previamente (Saenz-de-Juano et al., 2010).

## 6. CONCLUSIONES

De la discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que:

- Los embriones de 24 horas recuperados y transferidos a una hembra receptora presentan un descenso en la calidad embrionaria en términos de expresión del mRNA del gen de pluripotencialidad Sox2.
- La transferencia embrionaria temprana (24 horas) no altera la paternidad de la descendencia obtenida utilizando inseminación artificial con mezcla heterospermica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

ALBANI, E.; CASTELLANO, S.; GURRIERI, B.; ARRUZZOLO, L.; NEGRI, L.; BORRONI, E. Y LEVI-SETTI (2019). Male age : negative impact on sperm DNA fragmentation. *Aging*, 11(9), 2749–2761.

ALBEROLA, A. (2018). Efecto del tiempo de cultivo sobre la viabilidad y desarrollo de embriones de conejo (Tesis de pregrado). Universitat Politècnica de València, Valencia.

ALMASI-HASHIANI, A.; OMANI-SAMANI, R.; MOHAMMADI, M.; AMINI, P.; NAVID, B.; ALIZADEH, A. KHEDMATI, E. Y MAROUFIZADEH, S. (2019). Assisted reproductive technology and the risk of preeclampsia : an updated systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 19(1), 1–13.

ASRM (2015). Obesity and reproduction: A committee opinion. *Fertility and Sterility*, 104(5), 1116–1126.

ASRM (2017). Performing the embryo transfer: a guideline. *Fertility and Sterility*, 107(4), 882–896.

BALDI, E. Y MURATORI, M. (2014). *Genetic Damage in Human Spermatozoa*. Ed. Springer.

BANDEL, I.; BUNGUM, M.; RICHTOFF, J. MALM, J.; AXELSSON, J.; PEDERSEN, H.S.; LUDWICKI, J.K.; CZAJA, K.; HERNIK, A.; TOFT, G.; BONDE, J.P.; SPANÒ, M.; MALM, G.; HAUGEN, T.B. Y GIWERCMAN, A. (2015). No association between body mass index and sperm DNA integrity. *Human Reproduction*, 30(7), 1704–1713.

BEST, B. P. (2015). Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research*, 18(5), 422–436.

BOGNAR, Z.; CSABAI, T. J.; PALLINGER, E.; BALASSA, T.; FARKAS, N.; SCHMIDT, J.; GÖRGEY, E.; BERTA, G.; SZEKERES-BARTHO, J. Y BODIS, J. (2019). The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of preimplantation murine embryos. *Journal of Reproductive Immunology*, 132, 21–28.

BOUILLON, C.; LÉANDRI, R.; DESCH, L.; ERNST, A. Y BRUNO, C. (2016). Does Embryo Culture Medium Influence the Health and Development of Children Born after *In Vitro* Fertilization ? *PLoS ONE*, 11(3), e0150857.

BRADFORD, G. E. Y KENNEDY, B. W. (1980). Genetic aspects of embryo transfer. *Theriogenology*, 13(1), 13–26.

CABAÑAS, F.; LÓPEZ-AZORÍN, M. Y PELLICER, A. (2009). Assisted reproduction techniques and the health of the newborn. *Anales de Pediatría*, 70(4), 319–322.

CAMPBELL, J. M.; LANE, M.; OWENS, J. A. Y BAKOS, H. W. (2015). Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(5), 593–604.

CÁNEPA, M. J.; ORTEGA, N. M.; MONTELEONE, M. C.; MUCCI, N.; KAISER, G. G.; BROCCO, M. Y MUTTO, A. (2014). Expression profile of genes as indicators of developmental competence and

quality of *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *PLoS one*, 9(9), e108139.

CANOVAS, S.; ROSS, P. J.; KELSEY, G. Y COY, P. (2017). DNA Methylation in Embryo Development: Epigenetic Impact of ART (Assisted Reproductive Technologies). *BioEssays*, 39(11), 1–11.

CHAMBERS, I. Y TOMLINSON, S. R. (2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*, 136(14), 2311–2322.

CHANTRY-DARMON, C.; URIEN, C.; HAYES, H.; BERTAUD, M.; CHADI-TAOURIT, S.; CHARDON, P.; VAIMAN, D. Y ROGEL-GAILLARD, C. (2005). Construction of a cytogenetically anchored microsatellite map in rabbit. *Mammalian Genome*, 16(6), 442–459. doi:10.1007/s00335-005-2471-z

CHEN, M. Y HEILBRONN, L. K. (2017). The health outcomes of human offspring conceived by assisted reproductive technologies (ART). *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(04), 388–402.

COOKE, S.; QUINN, P.; KIME, L.; AYRES, C.; TYLER, J. P. Y DRISCOLL, G. L. (2002). Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertility and Sterility*, 78(6), 1254–1260.

DE GEYTER, C.; CALHAZ-JORGE, C.; KUPKA, M. S.; WYNS, C.; MOCANU, E.; MOTRENKO, T.; SCARAVELLI, G.; SMEENK, J.; VIDAKOVIC, S.; GOOSSENS, V. Y EMI-ESHRE (2018). ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE. *Human Reproduction*, 33(9), 1586–1601.

DE LA ROCHEBROCHARD, E. Y THONNEAU, P. (2002). Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Human Reproduction*, 17(6), 1649–1656.

DE PLACIDO, G. (2002). High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Human Reproduction*, 17(9), 2402–2409.

DURANTHON, V. Y CHAVATTE-PALMER, P. (2018). Long term effects of ART: What do animals tell us? *Molecular Reproduction and Development*, 85(4), 348–368.

EIM-ESHRE, CALHAZ-JORGE, C.; DE GEYTER, C.; KUPKA, M.S.; DE MOUZON, J.; ERB, K.; MOCANU, E.; ...BARANOWSKI, R. (2016). Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 31(8), 1638–1652.

FADDY, M. J.; GOSDEN, R. G.; GOUGEON, A.; RICHARDSON, S. J. Y NELSON, J. F. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause. *Human Reproduction*, 7(10), 1342–1346.

FARHANGNIYA, M.; DORTAJ RABORI, E.; MOZAFARI KERMANI, R.; HAGHDOOST, A. A.; BAHRAMPOUR, A.; BAGHERI, P.; LANCASTER, A.; ASHRAFI, M.; VOSOUGH, A.; GOURABI, H. Y SHAHZADEH, A. (2013). Comparison of Congenital Abnormalities of Infants Conceived by Assisted Reproductive Techniques versus Infants with Natural Conception in Tehran. *International journal of fertility Y sterility*, 7(3), 217–224.



FERREIRA, C. E.; SÁVIO, D. B.; GUARISE, A. C.; FLACH, M. J.; GASTAL, G. D. A.; GONÇALVES, A. O.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALONSO, R.V.; BIANCHI, I.; CORCINI, C.D. Y LUCIA, T.(2014). Contribution of boars to reproductive performance and paternity after homospermic and heterospermic artificial insemination. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(7).

FISCHER, B. Y BAVISTER, B. D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Reproduction*, 99(2), 673–679.

FLANNIGAN, R. K.; CHOW, V.; MA, S. Y YUZPE, A. (2014). 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenesis: A case of successful sperm extraction. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada*, 8(1-2), E108–E110.

FLANNIGAN, R. Y SCHLEGEL, P. N. (2017). Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 44, 26–37.

FOYGEL, K.; CHOI, B.; JUN, S.; LEONG, D. E.; LEE, A.; WONG, C.; ZUO, E.; ECKART, M.; REIJO, R. WONG, W.H. Y YAO, M. (2008). A Novel and Critical Role for Oct4 as a Regulator of the Maternal-Embryonic Transition. *PLoS ONE*, 3(12), e4109.

FRIEDLER, S.; SCHACHTER, M.; STRASSBURGER, D.; ESTHER, K.; RON EL, R. Y RAZIEL, A. (2007). A randomized clinical trial comparing recombinant hyaluronan/recombinant albumin versus human tubal fluid for cleavage stage embryo transfer in patients with multiple IVF-embryo transfer failure. *Human Reproduction*, 22(9), 2444-2448.

GARCIA-DOMINGUEZ, X.; MARCO-JIMENEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. Y VICENTE, J. S. (2019). Minimally Invasive Embryo Transfer and Embryo Vitrification at the Optimal Embryo Stage in Rabbit Model. *Journal of Visualized Experiments*, (147).

GARDNER, D. K.; VELLA, P.; LANE, M.; WAGLEY, L.; SCHLENKER, T. Y SCHOOLCRAFT, W. B. (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and Sterility*, 69(1), 84–88.

GENDELMAN, M. Y ROTH, Z. (2012). Seasonal Effect on Germinal Vesicle-Stage Bovine Oocytes Is Further Expressed by Alterations in Transcript Levels in the Developing Embryos Associated with Reduced Developmental Competence<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 86(1).

GEORGE, K. Y KAMATH, M. (2010). Fertility and age. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 3(3), 121.

GLUJOVSKY, D.; FARQUHAR, C.; QUINTEIRO RETAMAR, A. M.; ALVAREZ SEDO, C. R. Y BLAKE, D. (2016). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6).

GOISSIS, M. D. Y CIBELLI, J. B. (2014). Functional Characterization of SOX2 in Bovine Preimplantation Embryos. *Biology of Reproduction*, 90(2).

HALLIDAY, J.; LEWIS, S.; KENNEDY, J.; BURGNER, D. P.; JUONALA, M.; HAMMARBERG, K.; AMOR, D.; DOYLE, L.; SAFFERY, R.; RANGANATHAN, S.; WELSH, L.; CHEUNG, M.; MCBAIN, J.; HEARPS, S. Y MCLACHLAN, R. (2019). Health of adults aged 22 to 35 years conceived by assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*.

- HATTORI, H.; HIURA, H.; KITAMURA, A.; MIYAUCHI, N.; KOBAYASHI, N.; TAKAHASHI, S.; OKAE, H.; KYONO, K.; KAGAMI, M.; OGATA, T. Y ARIMA, T. (2019). Association of four imprinting disorders and ART. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 1–12.
- HERNÁNDEZ-SILVA, G. Y CHIRINOS, M. (2019). Proteins from male and female reproductive tracts involved in sperm function regulation. *Zygote*, 27(1), 5-16.
- HIURA, H.; OKAE, H. Y CHIBA, H. (2014). Imprinting methylation errors in ART. *Reprod Med Biol*, 13(4), 193–202.
- HOSSEINI, S. H.; SADIGHI GILANI, M. A.; MEYBODI, A. M. Y SABBAGHIAN, M. (2017). The impact of RABL2B gene (rs144944885) on human male infertility in patients with oligoasthenoteratozoospermia and immotile short tail sperm defects. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(4), 505–510.
- HU, L.; DU, J.; LV, H.; ZHAO, J.; CHEN, M.; WANG, Y.; WU, F.; LIU, F.; CHEN, X.; ZHANG, J.; MA, H.; JIN, G.; SHN, H.; CHEN, L.; LING, X. Y HU, H. (2018). Influencing factors of pregnancy loss and survival probability of clinical pregnancies conceived through assisted reproductive technology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1).
- IUSSIG, B.; MAGGIULLI, R.; FABOZZI, G.; BERTELLE, S.; VAIARELLI, A.; CIMADOMO, D.; UBALDI, F. Y RIENZI, L. (2019). A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 98(5), 550–558.
- JANSZ, N. Y TORRES-PADILLA, M.-E. (2019). Genome activation and architecture in the early mammalian embryo. *Current Opinion in Genetics Y Development*, 55, 52–58.
- KUPKA, M. S.; FERRARETTI, A. P.; DE MOUZON, J.; ERB, K.; D’HOOGHE, T.; CASTILLA, J.; CALHAZ-JORGE, C.; DE GEYTER, C.; GOOSSENS, V. Y EIM-ESHRE (2014). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 29(10), 2099–2113.
- LAND, R. B. Y HILL, W. G. (1975). The possible use of superovulation and embryo transfer in cattle to increase response to selection. *Animal Production*, 21(1), 1–12.
- LEE, M. T.; BONNEAU, A. R. Y GIRALDEZ, A. J. (2014). Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 581–613.
- LEESE, H. J.; BAUMANN, C. G.; BRISON, D. R.; MCEVOY, T. G. Y STURMEY, R. G. (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Molecular Human Reproduction*, 14(12), 667–672.
- LI, G.; JIN, H.; NIU, W.; XU, J.; GUO, Y.; SU, Y. Y SUN, Y. (2018). Effect of assisted reproductive technology on the molecular karyotype of missed abortion tissues. *Bioscience Reports*, 38(5), BSR20180605.
- LIBERMAN, R. F.; GETZ, K. D.; HEINKE, D.; LUKE, B.; STERN, J. E.; DECLERCQ, E. R.; CHEN, X.; LIN, A. Y ANDERKA, M. (2018). Assisted Reproductive Technology and Birth Defects: Effects of Subfertility and Multiple Births. *Birth Defects Res*, 109(14), 1144–1153.

- LIU, Y.; ZHENG, H.; GUO, P.; FENG, S.; ZHOU, X.; YE, D.; CHEN, X. Y CHEN, S.(2017). DNA methyltransferase 3A promoter polymorphism is associated with the risk of human spontaneous abortion after assisted reproduction techniques and natural conception. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(2), 245–252.
- LUKE, B. (2017). Pregnancy and birth outcomes in couples with infertility with and without assisted reproductive technology: with an emphasis on US population-based studies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 217(3), 270–281.
- LUNA, M.; DUKE, M.; COPPERMAN, A.; GRUNFELD, L.; SANDLER, B. Y BARRITT, J. (2007). Blastocyst embryo transfer is associated with a sex-ratio imbalance in favor of male offspring. *Fertility and Sterility*, 87(3), 519–523.
- MACHTINGER, R. Y RACOWSKY, C. (2013). Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reproductive BioMedicine Online*, 26(3), 210–221.
- MAMO, S.; GAL, A.B.; POLGAR, Z. Y DINNYES, A. (2008). 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)
- MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VICENTE, J. S. (2017). Overweight in young males reduce fertility in rabbit model. *PLoS one*, 12(7), e0180679.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J.-S.; LAVARA, R.; BALASCH, S. Y VIUDES-DE-CASTRO, M.-P. (2010). Poor Prediction Value of Sperm Head Morphometry for Fertility and Litter Size in Rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5), 118-123.
- MASUI, S.; NAKATAKE, Y.; TOYOOKA, Y.; SHIMOSATO, D.; YAGI, R.; TAKAHASHI, K.; OKOCHI, H.; OKUDA, A.; MATOBA, R.; SHAROV, A.; MINORU, S. Y NIWA, H. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 625–635.
- MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M. Y YAMANAKA, S. (2003). The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell*, 113(5), 631–642.
- MOORE, L. D.; LE, T. Y FAN, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38.
- MOU, L.; WANG, Y.; LI, H.; HUANG, Y.; JIANG, T.; HUANG, W.; LI, Z.; CHEN, J.; XIE, J.; LIU, Y.; JIANG, Z.; LI, X.; YE, J.; CAI, Z. Y GUI, Y. (2013). A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia. *Human Genetics*, 132(2), 159–165.
- NERI, Q.; ROSENWAKS, Z. Y PALERMO, G. (2015). To ICSI or not to ICSI. *Seminars in Reproductive Medicine*, 33(2), 92–102.
- NICOL A. Y MCLAREN A. (1974). An effect of the female genotype on sperm transport in mice. *J Reprod Fertil*, 39(2), 421–424.

OIKONOMOU, Z.; CHATZIMELETIOU, K.; SIOGA, A.; OIKONOMOU, L.; TARLATZIS, B. C. Y KOLIBIANAKIS, E. (2017). Effects of vitrification on blastomere viability and cytoskeletal integrity in mouse embryos. *Zygote*, 25(1), 75–84.

ONO, R.; NAKAMURA, K.; INOUE, K.; NARUSE, M.; USAMI, T.; WAKISAKA-SAITO, N.; HINO, T.; SUZUKI-MIGISHIMA, R.; OGONUKKI, N.; MIKI, H.; KOHDA, T.; OGURA, A.; YOKOYAMA, M.; KANEKO-ISHINO, T. Y ISHINO, F. (2006). Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nature Genetics*, 38(1), 101–106.

PARRISH, J. J. Y FOOTE, R. H. (1985). Fertility Differences among Male Rabbits Determined by Heterospermic Insemination of Fluorochrome-labeled Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 33(4), 940–949.

PFAFFL, M.W. (2004). *Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla; p. 87-112.

POMP, D.; COWLEY, D. E.; EISEN, E. J.; ATCHLEY, W. R. Y HAWKINS-BROWN, D. (1989). Donor and recipient genotype and heterosis effects on survival and prenatal growth of transferred mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86, 493–500.

PROVOST, M. P.; ACHARYA, K. S.; ACHARYA, C. R.; YEH, J. S.; STEWARD, R. G.; EATON, J. L.; GOLDFARB, J.M. Y MUASHER, S.J. (2016). Pregnancy outcomes decline with increasing body mass index: Analysis of 239,127 fresh autologous *in vitro* fertilization cycles from the 2008-2010 Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertility and Sterility*, 105(3), 663–669.

PUGLISI, R.; POZZI, A.; FOGLIO, L.; SPANÒ, M.; ELEUTERI, P.; GROLLINO, M. G.; BONGIONI, G. Y GALLI, A. (2012). The usefulness of combining traditional sperm assessments with *in vitro* heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated *in vivo*. *Animal Reproduction Science*, 132(1-2), 17–28.

QAMAR, W.; KHAN, .R. Y ARAFAH, A. (2017). Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from Whole blood usis SDS-proteinase K method. *Saudi journal of biological sciences*, 24(7), 1465-1469.

QIN, Y.; CHOI, Y.; ZHAO, H.; SIMPSON, J. L.; CHEN, Z.-J. Y RAJKOVIC, A. (2007). NOBOX Homeobox Mutation Causes Premature Ovarian Failure. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 576–581.

REIGSTAD, M. M.; LARSEN, I. K.; ROBSAHM, E.; OLDEREID, N. B.; BRINTON, L. A. Y BRANCH, R. E. (2016). Risk of Cancer in Children Conceived by Assisted Reproductive Technology. *Pediatrics*, 137(3), e20152061.

REIJO, R.; LEE, T.; SALO, P.; ALAGAPPAN, M.; BROWN, L.; ROSENBERG, M.; ROZEN, S.; JAFFE, T.M.; STRAUS, D.; HOVATTA, O.; DE LA CHAPELLE, A.; SILBER, S. Y PAGE, D.C. (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics*, 10(4), 383–393.

Roche Applied Science, 2001. Technical note No. LC 13. Roche Diagnostics GmbH.

- SAENZ-DE-JUANO, M. D.; MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VICENTE, J. S. (2016). Embryo transfer manipulation cause gene expression variation in blastocysts that disrupt implantation and offspring rates at birth in rabbit. *European Journal of Obstetrics Y Gynecology and Reproductive Biology*, 207, 50–55.
- SAENZ-DE-JUANO, M. D.; PEÑARANDA, D. S.; MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VICENTE, J. S. (2014). Does vitrification alter the methylation pattern of OCT4 promoter in rabbit late blastocyst? *Cryobiology*, 69(1), 178–180.
- SAENZ-DE-JUANO, M.D.; PEÑARANDA, D.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; LLOBAT, L. Y VICENTE, J. (2010). Differential mRNA Expression in Rabbit *In vivo* Pre-implantatory Embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(4), 567–572.
- SAKURAI, T.; WATANABE, S.; KAMIYOSHI, A.; SATO, M. Y SHINDO, T. (2014). A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC biotechnology*, 14, 69.
- SCHERRER, U.; REXHAJ, E.; ALLEMANN, Y.; SARTORI, C. Y RIMOLDI, S. F. (2015). Cardiovascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. *European Heart Journal*, 36(25), 1583–1589.
- SCRIVEN, P. N.; FLINTER, F. A.; BRAUDE, P. R. Y OGILVIE, C. M. (2001). Robertsonian translocations--reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction*, 16(11), 2267–2273.
- SIMOPOULOU, M.; SFAKIANOUDIS, K. Y RAPANI, A. (2018). Considerations Regarding Embryo Culture Conditions : From Media to Epigenetics. *In Vivo*, 32(3), 451–460.
- SIMPSON, J. L. Y RAJKOVIC, A. (1999). Ovarian differentiation and gonadal failure. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*, 89(4), 186–200.
- SJÖBLOM, P.; MENEZES, J.; CUMMINS, L.; MATHIYALAGAN, B. Y COSTELLO, M. F. (2006). Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertility and Sterility*, 86(4), 848–861.
- SMITH, C. (1986). Use of embryo transfer in genetic improvement of sheep. *Animal Production*, 42(01), 81–88.doi:10.1017/s000335610001775x
- SMITH, C.; BERG, D.; BEAUMONT, S.; STANDLEY, N. T.; WELLS, D. N. Y PFEFFER, P. L. (2007). Simultaneous gene quantitation of multiple genes in individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction*, 133(1), 231–242.
- SPANDORFERL, S. D.; AVRECH, O. M.; COLOMBERO, L. T.; PALERMO, G. D. Y ROSENWAKS, Z. (1998). Effect of parental age on fertilization and pregnancy characteristics in couples treated by intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13(2), 334–338.
- SUNDERAM, S.; KISSIN, D. M.; CRAWFORD, S. B.; FOLGER, S. G.; BOULET, S. L.; WARNER, L. Y BARFIELD, W.D. (2018). Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2015. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C.: 2002)*, 67(3), 1–28. doi:10.15585/mmwr.ss6703a1

- SUNDERAM, S.; KISSIN, D. M.; CRAWFORD, S. B.; FOLGER, S. G.; JAMIESON, D. J.; WARNER, L. Y BARFIELD, W.D. (2017). Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2014. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C.: 2002)*, 66(6), 1–24.
- SUNDERAM, S.; KISSIN, D. M.; ZHANG, Y.; FOLGER, S. G.; BOULET, S. L.; WARNER, L.; CALLAGHAN, W.M. Y BARFIELD, W.D. (2019). Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2016. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C.: 2002)*, 68(4), 1–23.
- SWAMINATHAN, M.; GANESH, V.; KOSHY, T.; VENUGOPAL, P.; PAUL, S. Y VENKATESAN, V. (2016). A Study on the Role of Estrogen Receptor Gene Polymorphisms in Female Infertility. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 20(11), 692–695.
- SZAMATOWICZ, M. (2017). Assisted reproductive technology in reproductive medicine — possibilities and limitations. *Ginekologia Polska*, 87(12), 820–823.
- TAKAHASHI, M. (2012). Oxidative Stress and Redox Regulation on *In Vitro* Development of. *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 1–9.
- TARTAGLIA, N. R.; HOWELL, S.; SUTHERLAND, A.; WILSON, R. Y WILSON, L. (2010). A review of trisomy X. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(8), 1–9.
- UYAR, A. Y SELI, E. (2014). The impact of assisted reproductive technologies on genomic imprinting and imprinting disorders. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 26(3), 210–221.
- VALBUENA, D.; MARTIN, J.; DE PABLO, J. L.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Y SIMÓN, C. (2001). Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertility and Sterility*, 76(5), 962–968.
- VICENTE, J. S.; LAVARA, R.; MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VIUDES-DE-CASTRO, M. P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76(6), 1120–1125.
- VICENTE, J.; VIUDES-DE-CASTRO, M.-P.; LAVARA, R.; MOCÉ, E. (2004). Study of fertilising capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in rabbit using DNA markers. *Theriogenology*, 61(7-8), 1357–1365.
- VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; MÁZ PELLICER, A.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, X.; TALAVÁN, A. M. Y VICENTE, J. S. (2019). A single injection of corifollitropin alfa supplemented with hcg increase follicular recruitment and transferable embryos in the rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*.
- VUČIĆ, N. L. J.; NIKOLIĆ, Z. Z.; VUKOTIĆ, V. D.; TOMOVIĆ, S. M.; VUKOVIĆ, I. I.; KANAZIR, S. D.; SAVIĆ-PAVIĆEVIĆ, D. Y BRAJUSKOVIĆ, G.N. (2017). NOS3 gene variants and male infertility: Association of 4a/4b with oligoasthenozoospermia. *Andrologia*, 50(1), e12817.
- WALSH, T.; PERA, R. Y TUREK, P. (2009). The genetics of male infertility. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(02), 124–136.; 1–337. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1202301>

WANG, G.; ZHANG, J.; MOSKOPHIDIS, D. Y MIVECHI, N. F. (2003). Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. *Genesis*, 36(1), 48–61.

WANG, S.; TANG, X.; NIU, Y.; CHEN, H.; LI, B.; LI, T.; ZHANG, X.; HU, Z.; ZHOU, Q. Y JI, W. (2007). Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25, 481- 489.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; ADAMSON, G. D.; DE MOUZON, J.; ISHIHARA, O.; MANSOUR, R.; NYGREN, K.; SULLIVAN, E. Y VANDERPOEL, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009\*. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1520–1524.

ZHANG, S. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 305.

ZHU, J. L.; MADSEN, K. M.; VESTERGAARD, M.; OLESEN, A. V, BASSO, O. Y OLSEN, J. (2005). Paternal age and congenital malformations. *Human Reproduction*, 20(11), 3173–3177.

ZORRILLA, M. Y YATSENKO, A. N. (2013). The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. *Current Genetic Medicine Reports*, 1(4), 247–260.