

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Efecto de la vitrificación embrionaria sobre el número de mitocondrias en embriones preimplantacionales y en tejido hepático en conejo

TRABAJO FINAL DE GRADO
EN BIOTECNOLOGÍA
Curso Académico: 2018/2019

ALUMNA: BELÉN NAVARRO LÓPEZ
TUTOR: DAVID SÁNCHEZ PEÑARANDA



VALENCIA, JULIO 2019

Título del TFG: Efecto de la vitrificación embrionaria sobre el número de mitocondrias en embriones preimplantacionales y en tejido hepático en conejo.

Alumna: Dña. Belén Navarro López

Tutor académico: D. David Sánchez Peñaranda

Valencia, Julio 2019

Resumen: En la actualidad, entre un 1 y un 4% de los niños son concebidos mediante el empleo de técnicas de reproducción asistida (TRAs), siendo uno de los procedimientos más comunes la crioconservación de embriones. Esta técnica consiste en someter a los embriones a temperaturas bajo cero con el fin de detener su actividad metabólica al tiempo que se conserva su integridad. Hasta el momento, se ha considerado una herramienta biotecnológica neutra, pero trabajos previos en conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y otras especies parecen indicar lo contrario. A nivel embrionario se han observado alteraciones en el metabolismo energético, así como en la fase postnatal, registrando un menor peso de hígado, menor velocidad de crecimiento o menor peso al nacer. A nivel mitocondrial se han observado diferencias en la distribución de las mitocondrias, en su potencial de membrana y en la acumulación de especies reactivas de oxígeno, lo que convierte el análisis mitocondrial en una herramienta útil para el estudio del efecto de las TRAs.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la vitrificación embrionaria temprana en conejo sobre el número de mitocondrias tanto a nivel embrionario como postnatal. Para ello, se estableció una población control y otra vitrificada, y se puso a punto la cuantificación relativa de las mitocondrias. El análisis del número mitocondrial se llevó a cabo mediante la cuantificación del gen tRNA-Leu, específico del genoma mitocondrial, normalizado por la cuantificación del gen de la histona, específico del genoma celular, obteniéndose así el número de mitocondrias en base al número de células. Además, para evaluar el efecto a nivel pre- y postnatal, se emplearon 3 grupos experimentales: embriones de 6 días (prenatal) y animales de 9 semanas y 10 meses (postnatal).

Los resultados obtenidos en relación a la eficiencia de los genes seleccionados para el estudio mostraron que, tanto los primers como las condiciones de amplificación, eran adecuadas para llevar a cabo la cuantificación. Además, también se observó la evolución de las mitocondrias a lo largo de la vida del conejo. Se encontraron diferencias en el número de estas entre la etapa pre y postnatal, siendo mayor en la primera dada la energía requerida durante el desarrollo embrionario. Estas diferencias también fueron visibles entre animales juveniles y adultos. Con el fin de compensar la alteración de la actividad mitocondrial, los adultos presentaron un mayor número de estos orgánulos. Finalmente, se observaron diferencias significativas en la cantidad de mtDNA en embriones de 6 días. Los embriones del grupo vitrificado presentaban un aumento en los niveles de mtDNA si se comparaban con los del grupo control, revelando el efecto que las TRAs presentan en la cantidad de mitocondrias durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras provenientes de conejos de 9 semanas y 10 meses, lo que sugiere que este efecto disminuye con el desarrollo del individuo hasta normalizarse.

Palabras clave: vitrificación, plasticidad fenotípica, mitocondria, mtDNA, cuantificación relativa, conejo

Title: Effect of embryo vitrification on mitochondrial number in preimplantation embryos and hepatic tissue in rabbit.

Abstract: Nowadays, between 1% and 4% of children are conceived by assisted reproductive technologies (ARTs), being embryo cryopreservation one of the most common procedures. This technique is based on exposing embryos to sub-zero temperatures in order to stop their metabolic activity while preserving their integrity. Until now, it has been considered a neutral biotechnological tool, but studies on rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and other species seem to indicate the opposite. In embryos, alterations in the energy metabolism have been observed. Furthermore, lower liver weight, slower growth rate and lower birth weight have been shown as postnatal effects. At mitochondrial level, differences have been observed in the distribution of mitochondria, in their membrane potential and in the accumulation of reactive oxygen species, making the number of mtDNA copies a useful tool to study the effect of ARTs.

The objective of this work was to evaluate the effect of early embryo vitrification in rabbit on the number of mitochondria. To this end, 2 populations were developed, naturally conceived animals and vitrified embryos transferred to surrogate mothers. In addition, the relative quantification of the mitochondria was set up. The mitochondrial analysis was carried out by the quantification of tRNA-Leu, specific to the mitochondrial genome, normalized by the quantification of histone, specific to the cellular genome, obtaining the number of mitochondria based on the number of cells. Moreover, in order to evaluate both pre and postnatal effect, 3 experimental groups were also developed, which included 6 day-old embryos and animals between 9 weeks and 10 months of age.

The results obtained in relation to the efficiency of the genes selected for the study showed that both the primers and the amplification conditions were suitable to carry out the quantification. In addition, the mitochondria evolution throughout the rabbit's life was also observed. Differences in their number were found between pre and postnatal stage, being higher during the prenatal stage due to the energy required during the embryo development. These differences were also visible between juvenile and adult animals. In order to counteract the altered mitochondrial activity, adults had a greater number of these organelles. Finally, significant differences in the mtDNA quantity in 6 day-old embryos. Vitrified and transferred embryos had an increase in mtDNA levels when compared to naturally conceived embryos. These results revealed some of the effects that ARTs have in the number of mitochondria during embryonic development. However, no significant differences were found in the number of mtDNA copies in rabbits between 9 weeks and 10 months of age, suggesting that this effect decreases during the individual development until it normalizes.

Key words: vitrification, phenotypic plasticity, mitochondria, mtDNA, relative quantification, rabbit

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todos aquellos que han estado a mi lado durante esta etapa y que me han ayudado a llevar a cabo este proyecto.

En primer lugar, quiero agradecer a todas las personas del laboratorio por su ayuda y por acogerme así de bien. En especial quiero darle las gracias a Jose, por hacer posible que realizara este trabajo y por su pasión por la investigación, y a Amparo, por su paciencia y por ayudarme en todo lo que podía. También quiero agradecer a David, por todo su tiempo, dedicación y apoyo y por haber sido un fantástico tutor.

Gracias a todos mis compañeros. A Zaida y David por su infinita ayuda y por resolver todas mis dudas siempre que podían; a Noelia por hacer mucho más llevaderos los días de placas; a Paula y Laura por las risas y agobios mientras redactábamos; y en especial a Almudena por ser mi eterna compañera durante estos cuatro años, sin ti Biotecnología no habría sido lo mismo; a Jorge por todos esos momentos maravillosos en el laboratorio y por hacer que las horas de incubación pasaran más rápido; y a Josep por ser un gran apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio, por ser el mejor compañero de piso que podía pedir, y por tener siempre demasiada pasión.

A mis amigos, a los que en estos últimos cuatro años se han convertido en mi familia y a los que ya formaban parte de ella. Gracias por las eternas llamadas telefónicas, por los viajes, por todo lo que hemos compartido y sobre todo, gracias por ser y por estar. Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia por todo el cariño y por confiar siempre en mí. En especial a mi hermana por sus consejos, por entenderme y saber calmar mis agobios y por hacerme reír, te quiero infinito.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. Técnicas de Reproducción Asistida	1
1.1.1. TRAs y la plasticidad fenotípica	3
1.2. La crioconservación	4
1.2.1. Posibles riesgos relacionados con la crioconservación	5
1.3. Mitocondrias	6
1.3.1. mtDNA como marcador embrionario	8
1.4. El conejo como modelo animal	9
2.OBJETIVOS	11
3.MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Animales	12
3.2. Diseño experimental	12
3.3. Obtención de muestras y cuantificación relativa mitocondrial	14
3.3.1. Recuperación embrionaria	14
3.3.2. Muestras hepáticas	16
3.3.3. Extracción ADN	16
3.3.3.1. Muestras embrionarias	16
3.3.3.2. Muestras hepáticas	16
3.3.4. Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR)	16
3.3.4.1. Puesta a punto de la cuantificación relativa mitocondrial	18
3.4. Análisis estadístico	19
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. Recuperación embrionaria	20
4.2. Puesta a punto de la cuantificación relativa mitocondrial	20
4.3. Cuantificación relativa mitocondrial	22
5.CONCLUSIONES	27
6.BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema de la fosforilación oxidativa (KHAN ACADEMY, 2019)
- Figura 2** Molécula de tRNA-Leu (Gissi *et al.*, 1998)
- Figura 3** Resumen del diseño experimental
- Figura 4** Esquema del proceso de vitrificación y desvitrificación de embriones
- Figura 5** Ejemplo de embriones de 6 días del grupo control
- Figura 6** Rectas de eficiencia de los genes *H2AFZ* y tRNA-Leu.
- Figura 7** Gráfico de dispersión de la cuantificación del gen tRNA-Leu para los grupos control y vitrificado
- Figura 8** Gráfica de las medias de la cuantificación del gen tRNA-Leu en función del origen de las muestras
- Figura 9** Gráfica de las medias de la cuantificación del gen tRNA-Leu en función del grupo experimental

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Resumen de las técnicas de reproducción asistida (TRAs)
Tabla 2	Primers empleados en la PCR a tiempo real
Tabla 3	Condiciones de la PCR a tiempo real
Tabla 4	Concentraciones para cada gen empleadas en el cálculo de la eficiencia
Tabla 5	Resumen de embriones recuperados de las hembras donantes
Tabla 6	Eficiencias y correlación de la qPCR de cada uno de los genes seleccionados

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: análisis de la varianza

ARNt: ARN de transferencia

atan: arcotangente

ATP: adenosín trifosfato

BSA: albúmina de suero bovino

Ct: ciclo de amplificación

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfatos

DOHaD: orígenes durante el desarrollo de la salud y enfermedad

DPBS: tampón fosfato salino

Ef: eficiencia

EG: etilenglicol

FADH₂: flavín adenín dinucleótido

FSH-CTP: hormona corifolitropina alfa

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

H2AFZ: gen de la histona

hCG: gonadotropina coriónica humana

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides

ICTA: Instituto de Ciencia y Tecnología Animal

IVF: fecundación *in vitro*

kb: kilobases

MELAS: encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios stroke-like

MgCl₂: cloruro de magnesio

MII: metafase II

mtDNA: ADN mitocondrial

MT-ND1: gen mitocondrial que codifica para NADH deshidrogenasa

MT-TL1: gen mitocondrial que codifica para tRNA-Leu

N₂: nitrógeno molecular

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

nDNA: ADN nuclear

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

ROS: especies reactivas de oxígeno

TRAs: técnicas de reproducción asistida

UPV: Universidad Politécnica de Valencia

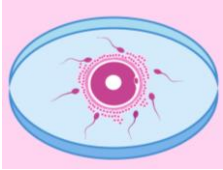
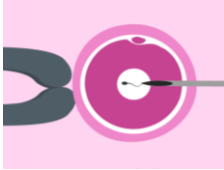
1. Introducción



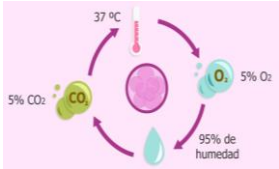
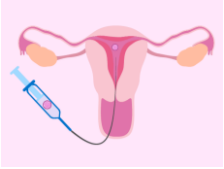

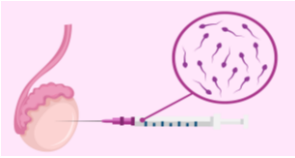
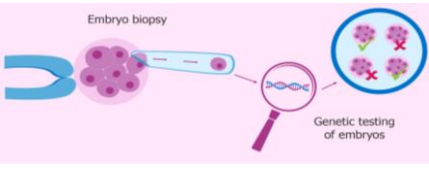
1.1. Técnicas de Reproducción Asistida (TRAs)

A partir del nacimiento de Louise Brown, el primer humano concebido por fecundación *in vitro* en 1978, más de 5 millones de niños han nacido por medio de las técnicas de reproducción asistida (TRAs) (Grafodatskaya *et al.*, 2013). De hecho, en la actualidad, entre un 1 y un 4% de los infantes son concebidos gracias al empleo de dichas técnicas (Feuer y Rinaudo, 2017). Es por esto por lo que las TRAs se consideran uno de los logros más importantes de la medicina reproductiva (Grafodatskaya *et al.*, 2013).

Las TRAs se encuentran en constante cambio con el fin de adaptarse a las necesidades de los pacientes (Vrooman y Bartolomei, 2017). Dentro de la gran diversidad que presentan (*Tabla 1*), las más comunes son la fecundación *in vitro* convencional (IVF) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Además, estas técnicas suelen ir acompañadas de otros procedimientos como son: la hiperestimulación ovárica controlada, la recuperación de oocitos, el cultivo de embriones y su transferencia.

Tabla 1. Resumen de las técnicas de reproducción asistida (TRAs).

PRINCIPALES TRAs			
IVF convencional		ICSI	
	<p>unión <i>in vitro</i> de espermatozoides con óvulos, ambos previamente extraídos, con el objetivo de que tenga lugar la inseminación y obtener embriones fecundados</p>		<p>extracción, a partir de una muestra de semen o de una biopsia testicular, de espermatozoides con el fin de seleccionar los más adecuados e inyectarlos en el citoplasma del óvulo. Se emplea cuando hay problemas de infertilidad masculina</p>

OTROS PROCEDIMIENTOS			
Hiperestimulación ovárica controlada		Recuperación de oocitos	
	tratamiento hormonal que busca la súper ovulación		aspiración de los folículos para conseguir óvulos
Cultivo de embriones		Transferencia de embriones	
	cultivo de los embriones tras la fecundación manteniendo las condiciones óptimas		introducción de embriones (estado de segmentación o blastocisto) a través del cérvix en el útero
Crioconservación gametos/embriones		Recuperación quirúrgica de espermatozoides	
	técnica consistente en sometes a gametos/embriones a temperaturas bajo cero para disminuir sus funciones y poder mantenerlos almacenados hasta su uso		extracción y recuperación de espermatozoides mediante la aspiración tanto en el epidídimo como en el testículo
Diagnóstico genético preimplantacional			
		prueba realizada a embriones antes de su implantación en el útero que detecta y previene la transmisión a la descendencia de enfermedades causadas por alteraciones genéticas	

Sin embargo, a pesar de todos los avances tecnológicos, las TRAs pueden conllevar diversas alteraciones. Se ha relacionado el uso de estas con nacimientos prematuros, un mayor riesgo de anomalías congénitas, menor peso al nacer, y un aumento, en adultos, de alteraciones metabólicas y cardiovasculares (Feuer y Rinaudo, 2017). Aún no están claras las causas de estos desórdenes, existiendo muchas incógnitas en torno a los efectos a corto y largo plazo de las TRAs (Grafodatskaya *et al.*, 2013).

Se ha sugerido que algunos de estos efectos adversos no se deben a estas técnicas, sino que pueden estar causados por problemas relacionados con la infertilidad (Chen y Heilbronn, 2017). Esta hipótesis surge, ya que, a pesar de que las TRAs también son utilizadas por parejas del mismo sexo o por padres solteros, la mayoría de los pacientes son parejas que presentan problemas reproductivos (Grafodatskaya *et al.*, 2013). La infertilidad se define como la incapacidad de una pareja de completar un embarazo tras un año de relaciones sexuales

frecuentes y sin medidas anticonceptivas (Cunningham, 2017), siendo actualmente un problema que afecta alrededor de 186 millones de personas en todo el mundo (Inhorn y Patrizio, 2015).

No obstante, en modelos animales que no presentan dichos problemas, como los ratones, se han aplicado las TRAs y se han observado complicaciones similares a las que se han descrito para los niños nacidos mediante estas técnicas. La aparición de efectos análogos en estos modelos animales y en niños tras la aplicación de TRAs lleva a pensar que realmente son los procedimientos de estas técnicas la causa de estas complicaciones y no se deben a razones asociadas con la infertilidad, como se sugirió en un principio (Vrooman y Bartolomei, 2017).

1.1.1. TRAs y la plasticidad fenotípica

Son numerosos los autores que han explicado el concepto de plasticidad fenotípica (Whitman y Agrawal, 2009). Esta se define con frecuencia como la capacidad de un solo genotipo para mostrar una serie de fenotipos diferentes en respuesta a variaciones en el entorno (Fordyce, 2006). Las diferencias fenotípicas entre las células de distintos órganos y tejidos de un mismo individuo son un claro ejemplo de este concepto (Sánchez-Alvarado y Yamanaka, 2014).

La plasticidad es en lo que se basa la hipótesis de los Orígenes Durante el Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (DOHaD). Dicha hipótesis afirma que las situaciones de estrés ambiental ocurridas durante el desarrollo de un organismo aumentan el riesgo de enfermedades (Vrooman y Bartolomei, 2017). Esto explica el por qué las TRAs pueden afectar al desarrollo embrionario, ya que el ambiente preconcepcional y prenatal en estas técnicas no es totalmente óptimo (Chen y Heilbronn, 2017). Además, al coincidir la aplicación de las TRAs con las primeras etapas de dicho desarrollo, estas pueden modificarlo causando cambios permanentes (Vrooman y Bartolomei, 2017). El desarrollo embrionario presenta unas rutas que no están totalmente fijadas, por lo que, en un ambiente de estrés, el embrión puede responder dando lugar a cambios fenotípicos para adaptarse a las nuevas condiciones (Vrooman y Bartolomei, 2017). Estos cambios fenotípicos son consecuencia de alteraciones en el epigenoma, proteoma, o en la expresión génica (Saenz-de-Juano *et al.*, 2011).

El uso de las TRAs y su relación con diversas enfermedades cardiometabólicas se considera una de las evidencias de la hipótesis DOHaD (Fleming *et al.*, 2015). En estudios llevados a cabo en ratones se ha observado que, tras el cultivo de embriones en estado preimplantacional y su posterior transferencia, aparecen en adultos alteraciones metabólicas y cardiovasculares como la hipertensión (Watkins *et al.*, 2007), la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina (Scott *et al.*, 2010; Donjacour *et al.*, 2014), metabolomas hepáticos anormales, y déficits de comportamiento (Ecker *et al.*, 2004; Fernández-Gonzalez *et al.*, 2004).

Los mecanismos epigenéticos son esenciales en la plasticidad. La epigenética se define como los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia del ADN (Wolffe y Matzke, 1999). La metilación del ADN es la marca epigenética más estudiada (Chen y Heilbronn, 2017). Esta consiste en la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina de los dinucleótidos CpG por la acción de un enzima. Por ejemplo, las células germinales llevan a cabo una reprogramación de los patrones de metilación del ADN durante la gametogénesis. Tras la fecundación, el epigenoma de los gametos es de nuevo desmetilado y remetilado, a excepción de los genes improntados, para adquirir la pluripotencialidad necesaria para el desarrollo embrionario (Vrooman y Bartolomei, 2017).

Existen numerosas evidencias que relacionan las TRAs con modificaciones epigenéticas. En niños nacidos por estas técnicas se ha observado una metilación del ADN alterada en diversos

genes implicados en desórdenes metabólicos (Song *et al.*, 2015). Las enfermedades de impronta, como el síndrome Beckwith-Wiedemann o el síndrome Angelman, que se asocian con una pérdida en la metilación del ADN, se presentan con mayor frecuencia en infantes concebidos mediante TRAs (Vrooman y Bartolomei, 2017). La placenta también puede sufrir cambios epigenéticos que desencadenen problemas a largo plazo (Chen y Heilbronn, 2017). Asimismo, estudios con modelos animales afirman que las TRAs afectan a las modificaciones epigenéticas alterando el desarrollo embrionario, fetal y postnatal (Chen *et al.*, 2014).

1.2. La crioconservación

Tras el primer nacimiento mediante IVF en 1978 apareció la necesidad de un procedimiento de crioconservación de embriones (Sparks, 2015). En un principio, debido a la baja tasa de éxito de las TRAs, era preciso transferir todos los embriones disponibles. Sin embargo, con el tiempo los procedimientos de estas técnicas comenzaron a mejorarse aumentando la tasa de embarazos. Este nuevo progreso conllevó un incremento en el riesgo de embarazos múltiples por lo que se decidió transferir un menor número de embriones y crioconservar los restantes para un posible uso futuro (Wong *et al.*, 2014).

El primer embarazo con transferencia de embriones crioconservados fue en 1983 en Alemania (Trounson y Mohr, 1983), mientras que se tuvo que esperar a 1984 para conseguir el primer nacimiento con este tipo de embriones (Zeilmaker *et al.*, 1984). Al principio, y como consecuencia de la baja tasa del éxito de esta técnica, la selección de embriones era muy relevante. Esto permitía transferir el mejor embrión en fresco y almacenar el resto. Sin embargo, la mejora en la crioconservación en los últimos años ha hecho que esta se convierta en una parte esencial para aumentar la tasa de natalidad de las TRAs (Wong *et al.*, 2014). Esto ocurre porque los programas de crioconservación permiten, tras realizar un análisis de marcadores morfológicos relacionados con la viabilidad de los embriones (Sparks, 2015), preservarlos en el tiempo, de una manera segura, para futuros ciclos de TRAs.

La crioconservación no solo es útil para transferir un menor número de embriones, permitiendo almacenar el resto, sino que también se emplea cuando: hay riesgo de hiperestimulación ovárica, en programas de donación de embriones, con el fin de preservar la fertilidad en personas que van a sufrir un tratamiento citotóxico (Wong *et al.*, 2014) o cuando se esperan resultados de algún test genético preimplantacional (Sparks, 2015).

Esta herramienta biotecnológica está basada en la preservación de una célula, tejido u organismo a temperaturas bajo cero, normalmente en nitrógeno líquido a -196°C . Es el procedimiento de almacenamiento a largo plazo más estable ya que, gracias a la bajada de temperatura, se detiene la actividad metabólica y se conserva la integridad del material crioconservado (Marco-Medina y Serrano-Martínez, 2012). Sin embargo, un descenso de temperatura da como resultado la formación letal de cristales de hielo intracelular, los principales causantes del daño celular relacionado con la crioconservación (Mazur, 1963).

La metodología más común para evitar este daño es deshidratar el espacio intracelular para reducir la formación de cristales (Wong *et al.*, 2014). Esto se consigue mediante la adición de crioprotectores al medio. Estos agentes se pueden clasificar en permeables y no permeables. Los crioprotectores permeables son sustancias de bajo peso molecular capaces de atravesar la membrana (Ávila-Portillo *et al.*, 2006) y desplazar el agua intracelular (Wong *et al.*, 2014). Ejemplos de estos crioprotectores son el etilenglicol (EG) o el dimetilsulfóxido (DMSO). Por otro lado, los no permeables son sustancias de alto peso molecular, efectivas si se emplean

velocidades altas de congelación (Fernández *et al.*, 2009), que al no entrar en la célula aumentan la concentración de solutos en el medio extracelular (Lazo-Javalera *et al.*, 2017). Esto genera un gradiente osmótico extracelular que provoca la deshidratación de la célula (Sparks, 2015). Se suelen combinar los crioprotectores no permeables con los permeables (Ávila-Portillo *et al.*, 2006), ya que, al aumentar la presión osmótica, causando la deshidratación celular, reducen la cantidad necesaria de crioprotector permeable y su posible toxicidad (Shaw *et al.*, 2000). La lactosa y la sacarosa son ejemplos que se pueden emplear como crioprotectores no permeables.

Sin embargo, los crioprotectores también tienen efectos negativos que se deben tener en cuenta. La toxicidad de estos puede causar modificaciones en la ultraestructura celular provocando desnaturalización de proteínas, alteraciones en el ADN y/o citoesqueleto. El crioprotector que más se suele emplear en la vitrificación de embriones es el EG ya que presenta una baja toxicidad celular (Kasai *et al.*, 1992; Kasai, 1997) y además difunde a gran velocidad a través de la membrana plasmática (Emiliani *et al.*, 2000).

En base a la concentración de crioprotectores utilizada, en la crioconservación se diferencian 2 técnicas: la congelación con bajas concentraciones de crioprotectores y velocidades de enfriamiento, y la vitrificación con altas concentraciones y velocidades de enfriamiento (Engelmann, 2000). La velocidad óptima de enfriamiento depende de cada célula y de su permeabilidad de membrana ya que, lo que se pretende con este proceso es que las células expulsen el agua de su interior lo suficientemente rápido como para evitar la creación de cristales intracelulares (Gao y Critser, 2000).

El método de congelación se caracteriza por emplear bajas tasas de enfriamiento (Wong *et al.*, 2014), normalmente una velocidad de 1°C/min, y concentraciones bajas de crioprotectores (Mandawala *et al.*, 2016). Las células se deshidratan de forma lenta mientras el medio externo se congela, lo que ayuda a reducir la formación de hielo intracelular. Las ventajas que presenta esta técnica son: un riesgo reducido de contaminación, y que no se requieren elevadas habilidades a la hora de la manipulación (Jang *et al.*, 2017).

Por otro lado, con la vitrificación lo que se busca es la deshidratación gracias a la exposición a altas concentraciones de crioprotectores (Sparks, 2015), en una proporción mayor al 40% (peso/volumen) (Yavin y Arav, 2007). Se emplea un enfriamiento ultrarrápido y se reduce el tiempo de exposición para prevenir la toxicidad (Fahy *et al.*, 1984). Gracias a todas estas condiciones se disminuye el riesgo de daño celular por formación de cristales (Jang *et al.*, 2017). Como consecuencia, las tasas de supervivencia celular son, con frecuencia, mayores en vitrificación que en congelación (Agca *et al.*, 1998). Otra ventaja que presenta este método es el menor tiempo de exposición de las células a las temperaturas de enfriamiento (Campos-Chillón *et al.*, 2006). Según Campos-Chillón *et al.* (2006), lo más recomendable es que las células se mantengan en condiciones no fisiológicas el menor tiempo posible antes de almacenarse a bajas temperaturas (-196°C), donde ya no hay actividad metabólica.

1.2.1. Posibles riesgos relacionados con la crioconservación

A pesar de que no hay estudios que relacionen la crioconservación con efectos genotóxicos, está demostrado que estas técnicas afectan al desarrollo y epigenoma de los embriones. Investigaciones realizadas en cerdo por Canovas *et al.* (2017), han mostrado que los embriones nacidos mediante TRAs presentan cambios epigenéticos y un patrón de expresión génica diferencial si se comparan con embriones concebidos de forma natural. Dichos estudios sugieren el papel esencial del ambiente durante la fecundación y el desarrollo embrionario posterior (Canovas *et al.*, 2017). Estas ideas son apoyadas por previas investigaciones, como las llevadas

a cabo por Kleijkers *et al.* (2014), evaluando el efecto del medio de cultivo en el desarrollo fetal humano. Sus estudios mostraron la sensibilidad del feto al ambiente, y la plasticidad fenotípica que este presenta para adaptarse a las variaciones del entorno. Se observó que el peso de los individuos durante los 2 primeros años de vida era diferente y cambiaba según el medio donde se habían cultivado los embriones. Esto indica que el efecto del medio de cultivo provoca alteraciones en el embrión que afectan al desarrollo y crecimiento (Dumoulin *et al.*, 2010) y que estas perduran en el tiempo. Por tanto, los medios empleados en las TRAs, al convertirse en el ambiente del embrión durante varios días, pueden tener consecuencias persistentes en él (Kleijkers *et al.*, 2014).

En especies ganaderas, como el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), García-Domínguez *et al.* (2018) observó que, tanto la tasa de crecimiento como el peso corporal, además del peso de algunos órganos vitales como el hígado y el corazón, mostraban valores diferenciales cuando se comparaba la población control con una población que había sido sometida a una vitrificación embrionaria temprana (3 días postinseminación). Además, estas diferencias se mantenían tanto en animales juveniles como adultos, indicando que algunos de los efectos de la vitrificación pueden persistir durante toda la vida del animal (García-Domínguez *et al.*, 2018). En estudios realizados por Gupta *et al.* (2017), se llegó a la conclusión de que la vitrificación de embriones bovinos provocaba una menor expresión en genes implicados en el metabolismo lipídico. De hecho, Saenz-de-Juano *et al.* (2014), también observó, en placenta de fetos de conejo de 14 días, que tras la aplicación de un proceso de vitrificación embrionaria temprana (3 días postinseminación), el metabolismo lipídico se encontraba alterado.

También se han llevado a cabo análisis multi-ómicos del tejido hepático de conejos adultos que han manifestado la posible asociación entre las modificaciones, tanto en el metabolismo lipídico como en el energético, con el peso de los individuos. De hecho, en los resultados proteómicos se observó la expresión diferencial de proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa (García-Domínguez *et al.*, 2018). Como este proceso se lleva a cabo en las mitocondrias, García-Domínguez *et al.* (2018) sugirió que la vitrificación dañaba estos orgánulos en los embriones, y que esto podía heredarse en cada replicación celular, afectando también a animales en estado adulto. Todo esto es una clara manifestación de la plasticidad fenotípica que presentan los embriones, donde las variaciones en el metabolismo inducen a una menor tasa de crecimiento y una diferencia en el peso corporal y de órganos (Forsman, 2015).

A día de hoy, son numerosas las evidencias que relacionan las TRAs, y más específicamente la crioconservación, con alteraciones tanto embrionarias como a nivel postnatal. Sin embargo, no hay muchos estudios en los que se analicen los efectos a largo plazo (adulto) que puedan llevar consigo estas modificaciones (Lavara *et al.*, 2015). En base a los resultados tanto a nivel molecular como fenotípico en embriones y en hígado de individuos adultos, se planteó evaluar el efecto de la vitrificación sobre las mitocondrias desde el estado embrionario hasta el nivel adulto.

1.3. Mitocondrias

En relación con algunos problemas que presentan las TRAs, existen evidencias que asocian la función y la actividad de las mitocondrias con el desarrollo embrionario. Debido a esta relación, la investigación de la actividad mitocondrial durante el desarrollo embrionario se ha convertido en un área muy importante en la medicina reproductiva (Cecchino y Garcia-Velasco, 2018).

Las mitocondrias son uno de los orgánulos más abundantes de las células eucariotas (Jing *et al.*, 2018). Estas presentan un papel regulador clave en diversos procesos celulares como la apoptosis o la homeostasis del calcio. Además, se encargan de generar ATP a través de la ruta metabólica conocida como fosforilación oxidativa (Fragouli y Wells, 2015). Este proceso consiste en la oxidación tanto del NADH como del FADH₂, transfiriendo sus electrones al oxígeno molecular. Esto se lleva a cabo a través de unos transportadores de electrones presentes en la membrana interna de la mitocondria y tiene como resultado la obtención de ATP como se observa en la *Figura 1*.

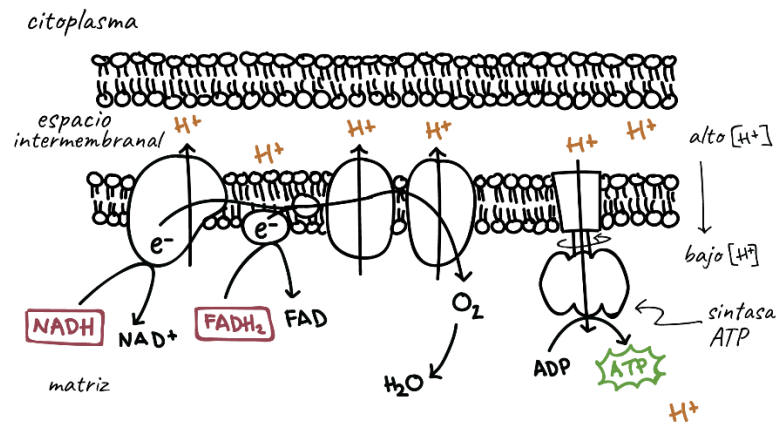


Figura 1. Esquema de la fosforilación oxidativa (KHAN ACADEMY, 2019).

Una de las características que diferencia a las mitocondrias del resto de orgánulos que contiene una célula, es que esta presenta una o más copias de su propio genoma. Este genoma mitocondrial (mtDNA) está localizado en la membrana interna de la mitocondria y tiene un tamaño de aproximadamente 16,6 kb (Fragouli y Wells, 2015). Se trata de una doble hebra circular que, en humanos, codifica para un total de 13 genes con un papel relevante en el metabolismo celular. Más concretamente, estos genes están relacionados con la construcción de las subunidades de los complejos I, III, IV y V (Jing *et al.*, 2018). Un ejemplo de gen codificado por el mtDNA es *MT-TL1*. Este gen codifica para una forma específica de ARNt que se conoce como tRNA-Leu (*Figura 2*). La función de esta molécula consiste en unirse al aminoácido leucina para colocarlo en el sitio adecuado y formar proteínas implicadas en el proceso de fosforilación oxidativa (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2019). En conejo, el gen que codifica para tRNA-Leu tiene un tamaño de 75 pb (Gissi *et al.*, 1998).

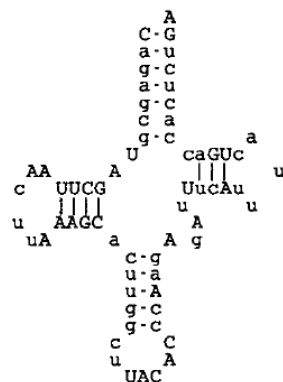


Figura 2. Molécula de tRNA-Leu (Gissi *et al.*, 1998).

La elevada tasa de mutaciones, posiblemente debido a la proximidad a la cadena respiratoria y la ausencia de histonas, es una de las peculiaridades del mtDNA. A esto se le suman otras características de gran relevancia como que las mutaciones puntuales aumentan con la edad de las células (Cecchino y Garcia-Velasco, 2018), y que la cantidad de mtDNA en embriones se mantiene invariable durante los 3 primeros días del desarrollo preimplantacional (Fragouli *et al.*, 2015).

La herencia de las mitocondrias y su genoma es otra característica distintiva de estos orgánulos. Esta no sigue un patrón mendeliano ya que se hereda exclusivamente de la madre (Fragouli y Wells, 2015). Se ha demostrado mediante estudios con modelos animales y con humanos que, tras el proceso de fecundación, no se detectan mitocondrias de origen paterno en embriones de más de 4 células. Actualmente, no existe una teoría que explique el porqué de esta herencia selectiva y tampoco se conocen con exactitud los mecanismos responsables de la eliminación de las mitocondrias paternas (Cecchino *et al.*, 2018). De todas las hipótesis destaca la basada en una coexistencia de un mecanismo proteolítico mediado por la ubiquitina (Sutovsky *et al.*, 1999) y una mitofagia que se desencadena tras la fecundación (Sato y Sato, 2011).

1.3.1. mtDNA como marcador embrionario

La correlación de la disfunción mitocondrial con la baja calidad del oocito, además de problemas en la fecundación y desarrollo embrionario, demuestra el papel clave que juega la actividad mitocondrial tanto en el oocito como en el embrión. Es por esto, que se ha sugerido que el número de copias del mtDNA puede emplearse como biomarcador de la viabilidad embrionaria (Cecchino y Garcia-Velasco, 2018).

Los oocitos en metafase II (MII) en humanos presentan alrededor de 1.500.000 moléculas de mtDNA, siendo las células que más mtDNA contienen (Barritt *et al.*, 2002). En 1999 aparecieron los primeros estudios que indicaban una correlación negativa entre la concentración de mtDNA en los oocitos MII humanos y la edad de la mujer. Estos estudios apoyan la hipótesis de que la baja calidad de los oocitos en personas de mayor edad puede ser debida en parte por la reducción de la cantidad de mtDNA (de Boer *et al.*, 1999). Otra evidencia que apoya esta teoría es la reducción de mtDNA durante la senescencia reproductiva en humanos (Chan *et al.*, 2005; Murakoshi *et al.*, 2013). También se ha observado en diversos estudios que los oocitos de pacientes con baja reserva ovárica tienen menor cantidad de mtDNA que las mujeres con una reserva ovárica normal. Estos resultados refuerzan el uso del número de copias del mtDNA como biomarcador de calidad embrionaria, ya que muestran la importancia de su presencia durante la oogénesis y, por tanto, en el desarrollo temprano del embrión (Cecchino y Garcia-Velasco, 2018).

Diversos estudios han demostrado no solo alteraciones en el número de mitocondrias, sino también en la actividad mitocondrial. Por un lado, la sensibilidad de las mitocondrias a los cambios de temperatura hace que la vitrificación altere parámetros relacionados con su distribución en oocitos MII ovinos. La correcta localización de las mitocondrias es de gran relevancia para la función celular, por lo que modificaciones en esto hace que se reduzca su capacidad de generar ATP y de desarrollo tanto en oocitos como en embriones (Succu *et al.*, 2018).

Por otro lado, se ha señalado, también en oocitos MII ovinos, que la vitrificación afecta al potencial de membrana de las mitocondrias (Succu *et al.*, 2018). Cuando dicho potencial se reduce, también disminuye la eficiencia de producir ATP, y la concentración de esta molécula

está relacionada con la fecundación y el desarrollo embrionario, como se ha observado en estudios realizados en oocitos MII porcinos (Dai *et al.*, 2015).

Finalmente, se ha observado que, en oocitos MII ovinos, la vitrificación aumenta la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Succu *et al.*, 2018). Este incremento en la cantidad de ROS afecta a los complejos mitocondriales I, II y III, originando la pérdida de su actividad. Como resultado produce una bajada en la producción energética (Zhang *et al.*, 2017). Además, en embriones murinos, se ha observado que el alto nivel de ROS puede alterar el número de copias de mtDNA (Ebert *et al.*, 1988). Estudios realizados en ratones han revelado que, en oocitos vitrificados se observa una reducción en el número de copias de mtDNA en comparación con oocitos sin vitrificar (Amoushahi *et al.*, 2017). Con todo esto se puede llegar a la conclusión de que el aumento en ROS es la causa de la disminución en el número de copias del mtDNA. Al mismo tiempo, debido esta reducción del mtDNA, la actividad de enzimas implicadas en la fosforilación oxidativa y en la obtención de energía se pueden ver alteradas (Zhang *et al.*, 2011; Hori *et al.*, 2009).

Por tanto, no cabe duda del papel esencial de las mitocondrias en el desarrollo embrionario. Aunque existen evidencias que muestran que los procedimientos llevados a cabo durante la vitrificación derivan en una disfunción mitocondrial, modificando su distribución y potencial de membrana, son pocos los estudios que evalúan los cambios en el número de copias del mtDNA tras la vitrificación (Amoushahi *et al.*, 2017). Esto, sumado a las escasas investigaciones que analizan los efectos en la actividad mitocondrial adulta tras la aplicación de estas técnicas, hacen que sea muy relevante continuar investigando en este campo.

1.4. El conejo como modelo animal

El gran número de evidencias que apoyan la hipótesis DOHaD han hecho que el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) sea ampliamente empleado como modelo en biología reproductiva y desarrollo embrionario (Fischer *et al.*, 2012). Como se ha comentado anteriormente, las etapas preconcepcional y prenatal son muy importantes ya que coinciden con momentos de reprogramación epigenética. En estos periodos las modificaciones para adaptarse al ambiente pueden causar desórdenes metabólicos con un efecto a largo plazo.

El conejo ha mostrado numerosas ventajas para ser un modelo de utilidad en el que observar la plasticidad fenotípica del embrión. Entre ellas se incluyen, un desarrollo embrionario similar al humano, una morfología y función placentaria equivalente en humanos y un conocimiento preciso tanto de la fecundación como de las etapas del desarrollo embrionario (Fischer *et al.*, 2012). Además, cabe destacar el gran tamaño de los blastocistos, lo que facilita su manipulación, y que los requisitos metabólicos de los embriones en conejos son análogos a los de los humanos (Püschel *et al.*, 2010). Asimismo, el genoma de esta especie está secuenciado, lo que permite, mediante el empleo de técnicas ómicas, analizar la expresión génica durante el desarrollo embrionario, y de este modo observar los efectos del ambiente (Fischer *et al.*, 2012).

Otras características que hacen del conejo un modelo animal de interés son su rápida reproducción, con un periodo de gestación de 30-32 días, y su capacidad de ovular poco después de concebir. Esto hace que una sola hembra pueda llegar a dar a luz a más de 60 crías cada año. La ovulación inducida es también una ventaja, ya que nos permite controlar el momento de la ovulación. Además, esta se puede inducir empleando un análogo sintético de la hormona gonadotropina, lo que permite que la inseminación artificial tenga una eficiencia del 70%-80% (Harcourt-Brown, 2017).

A todas estas ventajas hay que sumarle que son animales dóciles y no agresivos, lo que facilita su manejo. Además, los conejos son de pequeño tamaño y económicos a la hora de mantenerlos (Mapara *et al.*, 2012), haciendo que se utilicen como modelo no solo en la biología reproductiva sino en más áreas de la investigación, como la oftalmología o la toxicidad farmacológica (Foote y Carney, 2000).

2. Objetivos

A pesar de las evidencias que relacionan las TRAs con modificaciones tanto a nivel pre como postnatal, actualmente son pocas las investigaciones centradas en analizar los efectos a largo plazo que estas técnicas pueden llevar consigo. Las alteraciones registradas en el metabolismo energético en embriones, junto con las variaciones que se han descrito en la fase postnatal en el peso del hígado, la velocidad de crecimiento y el peso al nacer, llevan al planteamiento de los siguientes objetivos.

Objetivos específicos:

- Poner a punto la cuantificación del número de mitocondrias mediante PCR a tiempo real.
- Evaluar si hay diferencias en el número de mitocondrias a nivel pre y post natal.
- Evaluar el efecto de la vitrificación embrionaria temprana sobre el número de mitocondrias tanto a nivel embrionario como postnatal.

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales

Los animales utilizados en el presente estudio pertenecen a una de las líneas de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de origen neozelandés blanco desarrolladas en el ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Animal) de la UPV (Universidad Politécnica de Valencia). El mantenimiento de los animales se realizó en condiciones ambientales controladas, con 16 horas de luz y 8 de oscuridad y con una temperatura media de 17,5°C y máxima de 25,5°C. Además, estos se encontraban en jaulas individuales y se alimentaron con pienso comercial y libre acceso a agua filtrada.

El manejo de los conejos siguió los procedimientos aprobados por la *Generalitat Valenciana* para la instalación cunícola nº de registro 250V091, y según la legislación sobre experimentación animal del Real Decreto 53/2013 (BOE, 2013). El sacrificio de los animales para la recuperación embrionaria en un caso y para la obtención de muestras hepáticas en otro, se llevó a cabo siguiendo la directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos. Además, el estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (código 2018/VSC/PEA/0116).

3.2. Diseño experimental

Un resumen del diseño experimental se muestra en la *Figura 3*. Para poder evaluar el efecto de la vitrificación sobre el número de mitocondrias tanto a nivel embrionario como postnatal, se establecieron dos poblaciones: la población control y la vitrificada. Con el fin de crear la población vitrificada, las conejas fueron inseminadas y a los 3 días post-inseminación se sacrificaron para la obtención de los embriones y su posterior vitrificación y desvitrificación. Tras la desvitrificación de los embriones tempranos, estos se transfirieron a las hembras receptoras. El protocolo de vitrificación/desvitrificación y transferencia fue el desarrollado por Vicente *et al.* (1999), el cual se describirá con detalle en el apartado 3.3.1. La población control continuó con la gestación y crecimiento postnatal sin ninguna manipulación.

En ambas poblaciones, se sacrificaron los animales a los 6 días post-inseminación para la recuperación embrionaria, a las 9 semanas de vida (juvenil) y a los 10 meses (adulto). Además de poder evaluar el efecto de la vitrificación tanto a nivel pre- como postnatal, con el actual diseño también es posible analizar el efecto de la crioconservación justo antes de la implantación uterina, blástulas con 6 días de desarrollo post-inseminación, y, estudiar si existen diferencias a nivel hepático en el número de mitocondrias entre un animal prepúber (juvenil; 9 semanas) y uno maduro sexualmente (adulto; 40 semanas).

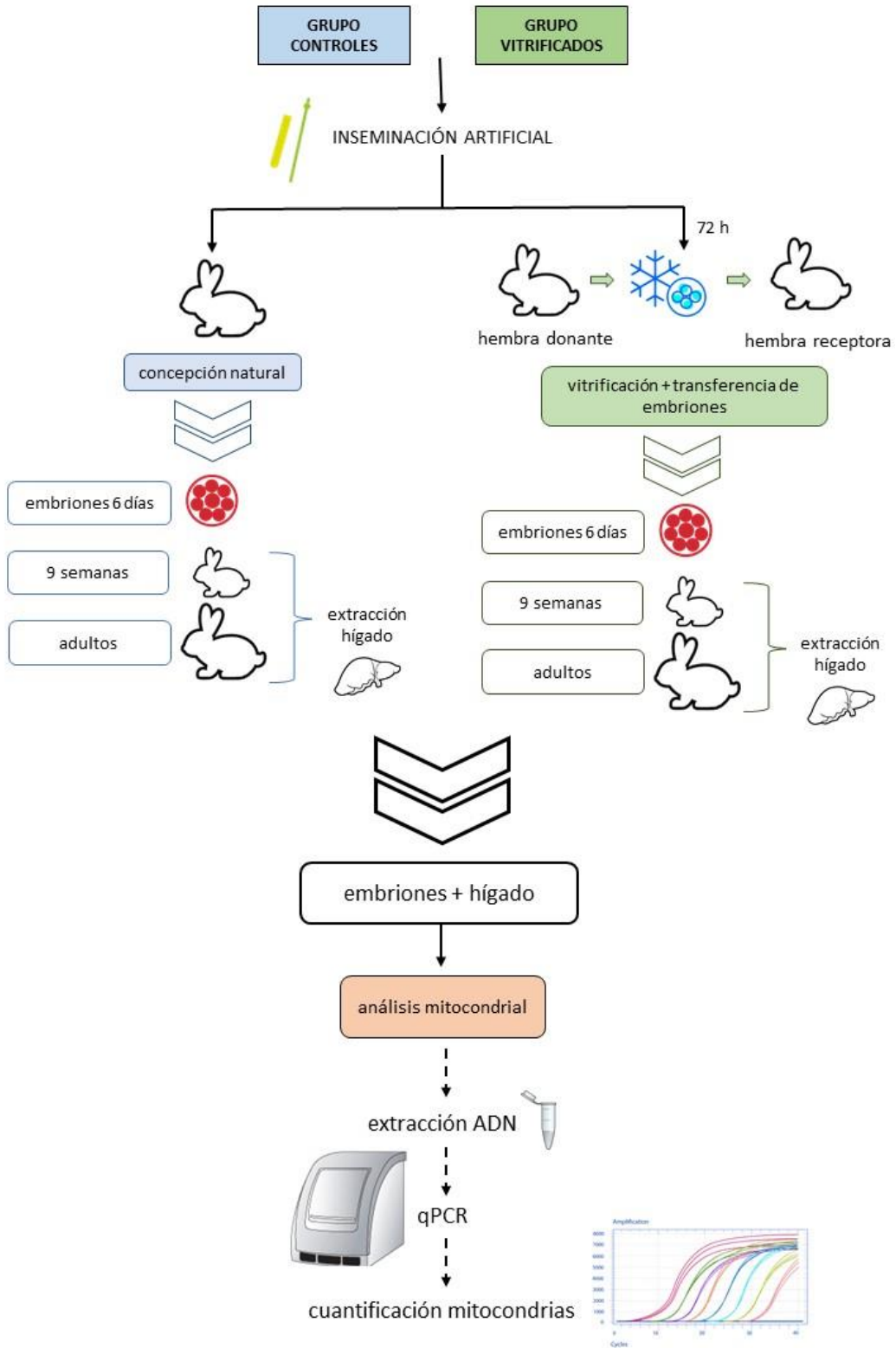


Figura 3. Resumen del diseño experimental.

Un esquema de los grupos experimentales en cada punto del estudio se muestra a continuación:

Grupo 1: embriones 6 días

- Grupo 1.1.: control (N=5)
- Grupo 1.2.: vitrificado (N=5)

Grupo 2: hígado conejos 9 semanas

- Grupo 2.1.: control (N=10)
- Grupo 2.2.: vitrificado (N=10)

Grupo 3: hígado conejos adultos

- Grupo 3.1.: control (N=10)
- Grupo 3.2.: vitrificado (N=13)

3.3. Obtención de muestras y cuantificación relativa mitocondrial**3.3.1. Recuperación embrionaria**

Las hembras donantes fueron superovuladas con una dosis vía subcutánea de la hormona Corifolitropina alfa suplementada con hCG (rFSH-CTP; Elonva®, 150 µg/mL, Merck Sharp & Dohme, S.A.; España). Estas conejas se inseminaron artificialmente tras 72 horas. Para ello, el mismo día se recuperó semen de machos empleando una vagina artificial según el procedimiento descrito por Vicente *et al.* (2011). El eyaculado se diluyó 1:5 en Tris-Cítrico-Glucosa (Viudes-de-Castro and Vicente, 1997) y, se realizó una valoración microscópica de la calidad y la concentración espermática para poder llevar a cabo la inseminación artificial. Los requerimientos que se buscaban eran una motilidad espermática superior al 70% y una cantidad de espermatozoides anormales menor al 25% (Marco-Jiménez *et al.*, 2010). Finalmente se realizó un pool de semen fresco con el que se inseminó a las donantes. Después de esto, se indujo la ovulación tanto de las donantes como de las receptoras mediante 1 µg de acetato de buserelina (Suprefact; Hoeclust Marion Roussel, S.A.; España), análogo sintético de la hormona GnRH.

Pasadas otras 72 horas, las donantes se sacrificaron para la obtención de los tractos reproductores y la recuperación de los embriones de 3 días. Esto se realizó mediante la perfusión de los oviductos con tampón fosfato salino (DPBS) suplementado con 0.2% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO, USA). Los embriones se recogieron en placas Petri estériles para, bajo una lupa binocular, seleccionarlos según su morfología (etapa adecuada de desarrollo, blastómeros homogéneos y zona pelúcida intacta).

El mismo día, siguiendo el procedimiento descrito por Vicente *et al.* (1999), se vitrificaron los embriones recuperados. Este método, que consta de dos etapas de vitrificación y una de desvitrificación, aparece esquematizado en la *Figura 4*.

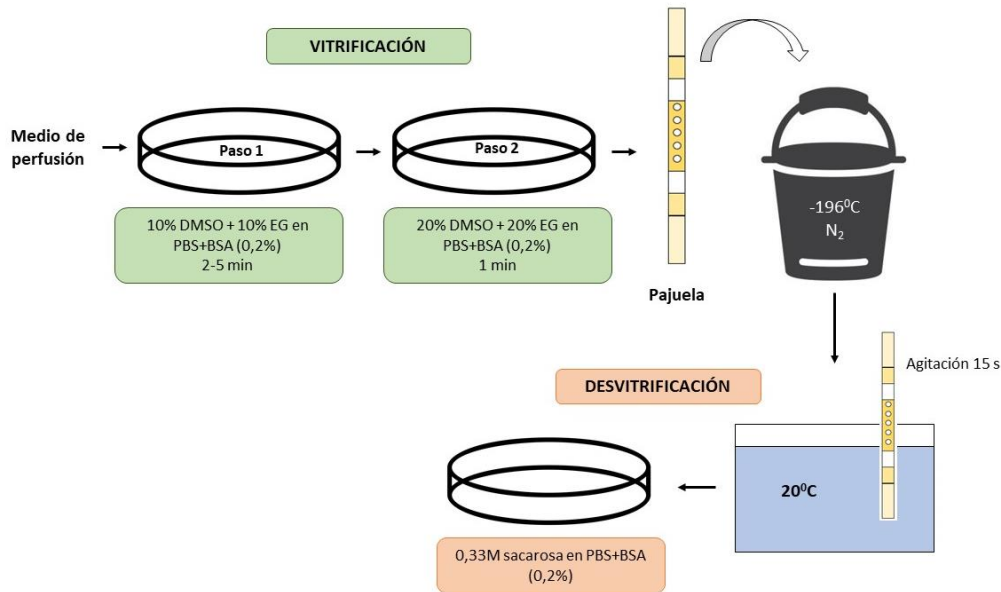


Figura 4. Esquema del proceso de vitrificación y desvitrificación de embriones.

La transferencia embrionaria a las hembras receptoras se realizó a continuación mediante laparoscopia y siguiendo el procedimiento descrito por Besenfelder y Brem (1993). Solo se transfirieron los embriones que no estaban dañados tras el proceso de vitrificación y desvitrificación (zona pelúcida intacta).

Finalmente, y de forma análoga a la recuperación de embriones de 3 días, se sacrificaron las hembras receptoras pasadas 72 horas más, para conseguir los blastocistos de 6 días del grupo de vitrificados.

En el caso de la obtención de los embriones de 6 días controles, se realizaron los mismos pasos a excepción de la primera recuperación embrionaria, donde estos se vitrificaron y se transfirieron a las hembras receptoras. Las hembras se inseminaron artificialmente y a los 6 días se sacrificaron para, mediante perfusión del oviducto con DPBS suplementado con BSA, obtener los embriones de 6 días (Figura 5).



Figura 5. Ejemplo de embriones de 6 días del grupo control.

3.3.2. Muestras hepáticas

Para la obtención de las muestras hepáticas de conejos tanto de 9 semanas como adultos, en ambas poblaciones, se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior (3.3.1). Sin embargo, a los 6 días las conejas no se sacrificaron para conseguir los embriones, sino que se dejó que las hembras receptoras, en el grupo de vitrificados, y las hembras inseminadas, en el grupo de controles, continuaran la gestación hasta el parto. En ambas poblaciones, los gazapos se mantuvieron hasta su sacrificio a las 9 semanas y 10 meses respectivamente, para la obtención de las muestras hepáticas.

3.3.3. Extracción ADN

3.3.3.1. Muestras embrionarias

Los embriones recuperados a los 6 días de desarrollo, en ambas poblaciones, fueron congelados en nitrógeno líquido y sonicados posteriormente para su homogeneización. Una vez homogeneizados en el tampón de lisis, el ADN fue extraído mediante una columna de purificación siguiendo el protocolo descrito en el Molecular Biology Kit EZ-10 Spin Column Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Bio Basic Inc., Canadá), a excepción del paso de proteinasa K, que se realizó incrementando la cantidad de proteinasa K a 80 μ L (20 mg/mL) y la incubación a 2 horas. Una vez extraído el ADN, la integridad y calidad de este fue analizado empleando el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®, Estados Unidos), y solo fueron analizadas aquellas muestras que mostraban valores de A230/280 entre 1,8-2,0.

3.3.3.2. Muestras hepáticas

Una vez obtenidas las muestras hepáticas, estas fueron almacenadas en RNAlater (Qiagen, España) a -20°C . Para la extracción de ADN de estas muestras, el tejido hepático fue homogeneizado en el tampón de lisis en el FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals, Estados Unidos) a 6,5 m/s durante 40 segundos. Una vez homogeneizado el tejido, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.3.1 empleando el Molecular Biology Kit EZ-10 Spin Column Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Bio Basic Inc., Canadá). Para evaluar tanto la concentración de las muestras como su calidad, también se empleó el espectrofotómetro Nanodrop 200 (Thermo Scientific®, Estados Unidos), seleccionando para su análisis las muestras con un rango de A230/280 de 1,8-2,0.

3.3.4. Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR)

Las mitocondrias tienen su propio ADN, diferencial del genoma celular. Por tanto, con el fin de poder cuantificar por un lado el número de células presentes en la muestra, así como el número de mitocondrias por célula, en el actual estudio se empleó la Reacción en cadena de la Polimerasa a tiempo real (qPCR) con el termociclador modelo LightCycler® 96 System (Roche, Suiza) y la enzima SYBR® Green como sistema de detección.

Con el objetivo de cuantificar el número de mitocondrias, se analizó la presencia de un gen específico del genoma mitocondrial: tRNA-Leu. Por otro lado, el número de células se cuantificó mediante la presencia de un gen específico del genoma celular como es la histona (*H2AFZ*). Se seleccionó este gen como referencia, porque, como se comentó en la Introducción, una de las peculiaridades del mtDNA es la ausencia de histonas (Cecchino y Garcia-Velasco, 2018). Por tanto, se esperaba que, a igualdad de concentración de ADN en una muestra, la presencia de la

histona permaneciera constante en los diferentes grupos experimentales. En la *Tabla 2* aparecen los genes empleados para el análisis, así como sus primers.

Tabla 2. Primers empleados en la PCR a tiempo real.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
H2AFZ	AGAGCCGGCTGCCAGTTCC	CAGTCGCGCCCACACGTCC
tRNA-Leu	GAGCCCGTAATTGCGTAAA	TGTTAAGGAGAGGAGTTGAACC

Para la cuantificación tanto celular como mitocondrial, previamente, todas las muestras de ADN fueron diluidas a una misma concentración de 10 ng/ μ L.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos con un volumen final por reacción de 10 μ L: 3 μ L de muestra de ADN diluido 1:20, 5 μ L de solución 2X de FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Suiza), que contiene el marcador SYBR® Green, 1 μ L del primer forward y 1 μ L del reverse (5 μ M).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una activación inicial de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 95°C 1segundo y 60°C 30 segundos. Con el fin de detectar amplificaciones inespecíficas, una vez finalizados los 40 ciclos, se realizó un análisis de la curva de disociación (*melting curve*) empleando una temperatura creciente de 0,1°C/s desde 65 a 97°C y un registro continuo de la fluorescencia. Finalmente, las muestras se sometieron a 37°C durante 30 segundos (*Tabla 3*).

Con el fin de normalizar las posibles variaciones entre los ensayos, en todas las placas se añadió un calibrador para cada uno de los genes seleccionados. En este estudio se utilizó una mezcla de ADN de todas las muestras como calibrador diluido 1/20, para que este fuera lo más representativo posible.

Tabla 3. Condiciones de la PCR a tiempo real.

FASE	Nº CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Preincubation	1	95°C	600 s
2 Step Amplification	40	95°C	1 s
		60°C	30 s
Melting	1	95°C	10 s
		65°C	60 s
		97°C	1 s
Cooling	1	37°C	30 s

3.3.4.1. Puesta a punto de la cuantificación relativa mitocondrial

Para medir el número de mitocondrias se empleó la cuantificación relativa en lugar de la absoluta. Este método, a diferencia de la cuantificación absoluta, no proporciona el número exacto de mitocondrias, sino que, en base a una curva estándar, se establecen unos valores arbitrarios a unas fluorescencias determinadas que permiten calcular el incremento o decremento en el número de mitocondrias en una muestra respecto a otra.

En los análisis estándar de expresión génica, los valores del gen en estudio se normalizan respecto a un gen de referencia. Para que un gen pueda ser utilizado como tal, este debe mantener constante su expresión en todos los grupos experimentales (Roche, 2001). En el actual trabajo no se está analizando la expresión génica, sino que se cuantifica el número de mitocondrias a través de la fluorescencia obtenida al amplificar el gen tRNA-Leu del mtDNA. Los valores obtenidos se normalizan por la fluorescencia obtenida al amplificar la histona que, al estar solo presente en el genoma celular, da un valor del número de células por muestra.

Por tanto, midiendo la fluorescencia al amplificar el tRNA-Leu, gen específico del genoma mitocondrial, respecto a la fluorescencia obtenida del gen de la histona, específico del genoma celular, es posible cuantificar de forma relativa el número de mitocondrias. Con el objetivo de llevar a cabo este análisis se empleó la *Ecuación 1* (Roche, 2001).

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

Ecuación 1.

La eficiencia de la qPCR se define como la capacidad que tiene la reacción para duplicar el número de copias de las cadenas de ADN en cada uno de los ciclos (Bustin y Nolan, 2004). Como la cuantificación relativa se basa en este principio, es necesario verificar que los primers empleados amplifican el ADN con la eficiencia adecuada (1,8-2,1). Para poder calcularla, es necesario realizar una curva estándar a partir de diversas diluciones seriadas (Svec *et al.*, 2015).

En el actual estudio, se utilizaron las siguientes diluciones 1/8, 1/32, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024 para el cálculo de la eficiencia de la histona, y las siguientes diluciones 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096 y 1/8192 para el cálculo de la eficiencia del tRNA-Leu. Una vez obtenido el ciclo de amplificación (Ct) para cada dilución, se representaron estos valores frente al logaritmo de una concentración arbitraria (*Tabla 4*). La gráfica obtenida permitió calcular la eficiencia de los genes en estudio mediante la *Ecuación 2*.

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Ecuación 2.

Tabla 4. Concentraciones para cada gen empleadas para el cálculo de la eficiencia.

DILUCIONES HISTONA	CONCENTRACIONES ARBITRARIAS HISTONA	DILUCIONES tRNA-Leu	CONCENTRACIONES ARBITRARIAS tRNA-Leu
1/8	$1,25 \cdot 10^{-1}$	1/256	$3,91 \cdot 10^{-3}$
1/32	$3,13 \cdot 10^{-2}$	1/512	$1,95 \cdot 10^{-3}$
1/128	$7,81 \cdot 10^{-3}$	1/1024	$9,77 \cdot 10^{-4}$
1/256	$3,91 \cdot 10^{-3}$	1/2048	$4,88 \cdot 10^{-4}$
1/512	$1,95 \cdot 10^{-3}$	1/4096	$2,44 \cdot 10^{-4}$
1/1024	$9,77 \cdot 10^{-4}$	1/8192	$1,22 \cdot 10^{-4}$

3.4. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Statgraphics Centurion XVII. Además, en todos los análisis solo se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores con un P-valor < 0,05. Para estudiar el efecto de la vitrificación sobre el número de copias del mtDNA, se empleó un análisis de la varianza (ANOVA). En primer lugar, se comprobó que todos los datos se ajustaban a una distribución normal, característica necesaria para realizar este análisis. Como esta condición no se cumplía, se llevó a cabo una normalización de los valores mediante una transformación angular (arcotangente). Tras esto, se realizó el ANOVA utilizando los valores de la cuantificación normalizados como variable dependiente y el grupo experimental (embrión 6 días control, embrión 6 días vitrificado, hígado 9 semanas control, hígado 9 semanas vitrificado, hígado adulto control e hígado adulto vitrificado) como factor fijo.

4. Resultados y Discusión

4.1. Recuperación embrionaria

Los embriones recuperados de las hembras donantes del grupo de embriones de 6 días vitrificados se muestran en la *Tabla 5*. Estos embriones fueron seleccionados según su morfología, como se ha comentado en el apartado 3.3.1. Los que no presentaban una morfología acorde a su etapa de desarrollo, blastómeros homogéneos o zona pelúcida intacta, se descartaron y no se llevó a cabo su posterior vitrificación/desvitrificación y transferencia.

Tabla 5. Resumen de embriones recuperados de las hembras donantes.

HEMBRAS DONANTES	TASA DE OVULACIÓN	TASA DE RECUPERACIÓN	EMBRIONES	% EMBRIONES RECUPERADOS
8	28	18	13	46,43%
13	31	15	15	48,39%
25	72	64	45	62,5%
30	56	47	44	78,57%
38	39	31	31	79,49%

Los resultados obtenidos muestran la tasa de ovulación, número de cuerpos lúteos en ambos ovarios, y el número de embriones que se recuperaron del tracto reproductivo de las hembras donantes y que cumplían con las características morfológicas explicadas en el apartado 3.3.1. También aparece el porcentaje de embriones recuperados, calculado como el número de embriones recuperados dividido por la tasa de ovulación (Cortell *et al.*, 2010). Las diferencias que se observan entre las conejas tanto en la tasa de ovulación como en la cantidad de embriones recuperados son debidas a que, a pesar de que se inseminaron hembras adultas que presentaban un aumento de la turgencia y la coloración de los labios vulvares, características externas indicadoras de receptividad, existe una gran variabilidad dentro los animales.

En comparación con otros ensayos en los que también se llevó a cabo la inseminación artificial de conejas superovuladas con FSH-CTP y la recuperación embrionaria, los resultados obtenidos en la tasa de ovulación son similares. En el presente estudio se obtuvo un valor de la tasa de ovulación de $45,2 \pm 8,3$, que se encuentra entre el realizado por Cortell *et al.* (2010), que fue de $16,8 \pm 1,1$ y el de Viudes-de-Castro *et al.* (2019), con un $51,1 \pm 2,5$. En cuanto a los embriones recuperados, el resultado fue de $63,1\% \pm 7,1$, inferior al obtenido por Cortell *et al.* (2010), que obtuvo un ratio de recuperación de $85,8\% \pm 3,3$. Como se ha comentado previamente, las diferencias en estos resultados se puede explicar por la gran variabilidad existente entre los animales.

4.2. Puesta a punto de la cuantificación relativa mitocondrial

En la *Figura 6* se muestra la gráfica con las rectas de eficiencia conseguidas a partir de las diluciones seriadas explicadas en el apartado 3.3.4.1 para los genes *H2AFZ* y *tRNA-Leu*.

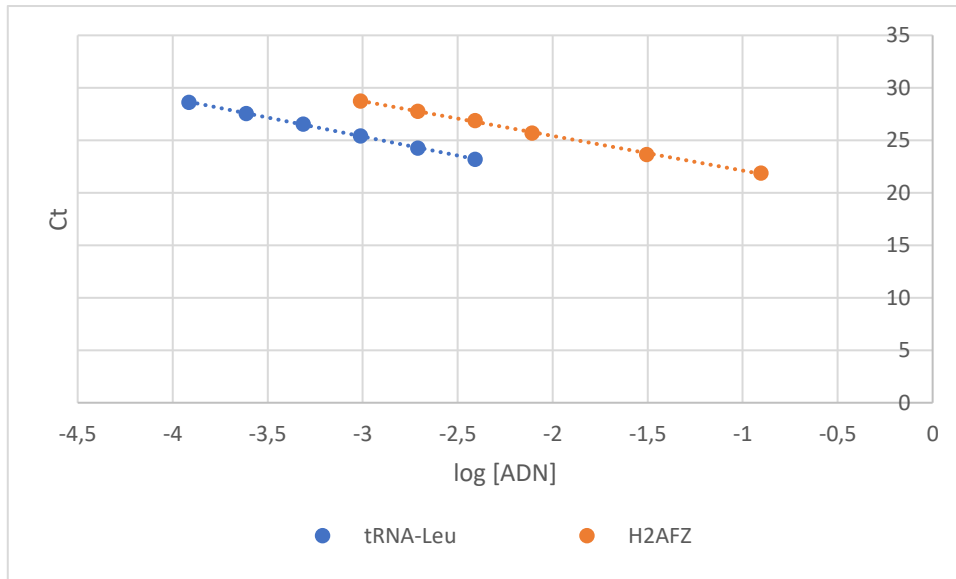


Figura 6. Rectas de eficiencia de los genes H2AFZ y tRNA-Leu.

Las rectas patrón de los genes seleccionados se ajustan a lo inicialmente esperado, rectas lineales y con pendiente negativa (Svec *et al.*, 2015).

Aplicando la Ecuación 2 es posible obtener la eficiencia de la qPCR para cada uno de los genes de interés. En la *Tabla 6* se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 6. Eficiencias y correlación de la qPCR de cada uno de los genes seleccionados.

GEN	CORRELACIÓN	EFICIENCIA
H2AFZ	0,99	2,01
tRNA-Leu	0,99	1,89

Los resultados de eficiencia para los genes H2AFZ y tRNA-Leu se encuentran dentro del rango exigido (1,80-2,10) (Zhang *et al.*, 2015). Por tanto, se puede afirmar que los primers y las condiciones de amplificación son las correctas para la cuantificación mitocondrial.

En los ensayos realizados para evaluar el número de copias de mtDNA mediante qPCR se suelen emplear como genes mitocondriales el *MT-ND1* (Chen *et al.*, 2017; Quiros *et al.*, 2017) y el *MT-TL1* (Rooney *et al.*, 2015), cuyas funciones están implicadas en el proceso de fosforilación oxidativa (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2019). En el presente estudio se escogió el gen tRNA-Leu ya que, alteraciones en dicho gen están asociadas con enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 (Van den Ouweland *et al.*, 1992), o con el síndrome MELAS (Moraes *et al.*, 1992), y por tanto, existe gran cantidad de estudios realizados con él.

En cuanto al método empleado para determinar la eficiencia de la qPCR en este estudio, la curva estándar es la herramienta más aceptada para estimarla (Bustin *et al.*, 2009) ya que se trata de un procedimiento que permite obtener una cuantificación sólida (Svec *et al.*, 2015).

4.3. Cuantificación relativa mitocondrial

El análisis de la cuantificación del gen tRNA-Leu se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la vitrificación embrionaria temprana, a nivel pre y postnatal, sobre el número de copias de mtDNA. En primer lugar, se estudió si había variación en la cuantificación de este gen entre los grupos controles y vitrificados, sin tener en cuenta si las muestras procedían de embriones o de hígado de animales de 9 semanas o de adultos. El análisis de los datos no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles y vitrificados para la presencia del gen tRNA-Leu, como se observa en la *Figura 7*.

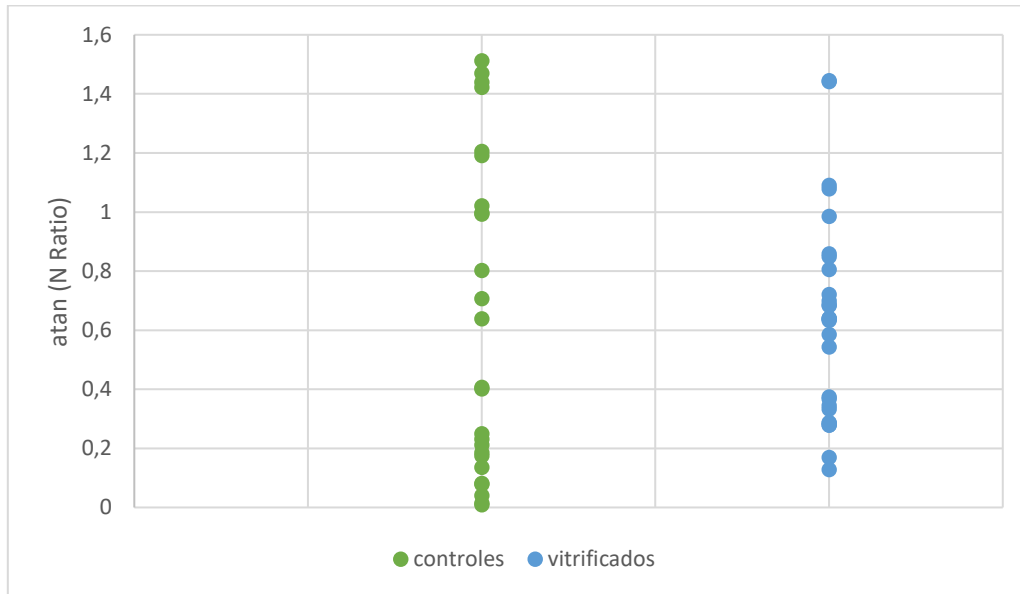


Figura 7. Gráfico de dispersión de la cuantificación del gen tRNA-Leu para los grupos control y vitrificado.

Como se ha comentado previamente en el apartado de Introducción, numerosos estudios apoyan el papel esencial de las mitocondrias en la fecundación y el desarrollo embrionario (Cecchino y Garcia-Velasco, 2018; de Boer *et al.*, 1999). Además, diversos autores han relacionado las técnicas de criopreservación de embriones con una menor actividad mitocondrial (Succu *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2015; Ebert *et al.*, 1988; Amoushahi *et al.*, 2017), sugiriendo el uso del número de copias del mtDNA como biomarcador de viabilidad embrionaria (Cecchino y Garcia-Velasco, 2018). Sin embargo, en los resultados observados en la *Figura 7* no aparecen diferencias significativas en la cuantificación de tRNA-Leu, y por tanto, en el número de copias del mtDNA, entre los grupos controles y vitrificados. Esto está causado porque el análisis se llevó a cabo sin distinguir la procedencia de las muestras, por lo que estos resultados no son concluyentes y es necesario efectuar un análisis más exhaustivo.

Además de realizar el análisis estadístico entre los grupos controles y vitrificados, se llevó a cabo el estudio de la cuantificación mitocondrial considerando, en este caso, solo el origen de la muestra (embriones de 6 días, hígado de 9 semanas e hígado de adultos), independientemente del grupo al que pertenecieran, con el fin de observar la evolución de estos orgánulos a lo largo de la vida del animal. En el caso de los embriones, se trabajó con la totalidad de estos para evaluar el número de copias de mtDNA. Sin embargo, en los grupos de 9 semanas y adultos, no se pudo analizar el animal por completo, por lo que se empleó una fracción del tejido hepático

para llevar a cabo el estudio mitocondrial. Se escogió este tejido ya que el hígado es un órgano metabólico esencial que se encarga de dirigir el metabolismo energético del cuerpo (Rui, 2014). Además, este órgano ya había mostrado, en estudios anteriores, diferencias tanto en la eficiencia de la cadena respiratoria (Stocco *et al.*, 1997) como en el peso, siendo menor en poblaciones vitrificadas (García-Domínguez *et al.*, 2018).

En la *Figura 8* se muestran los resultados obtenidos para cada grupo experimental.

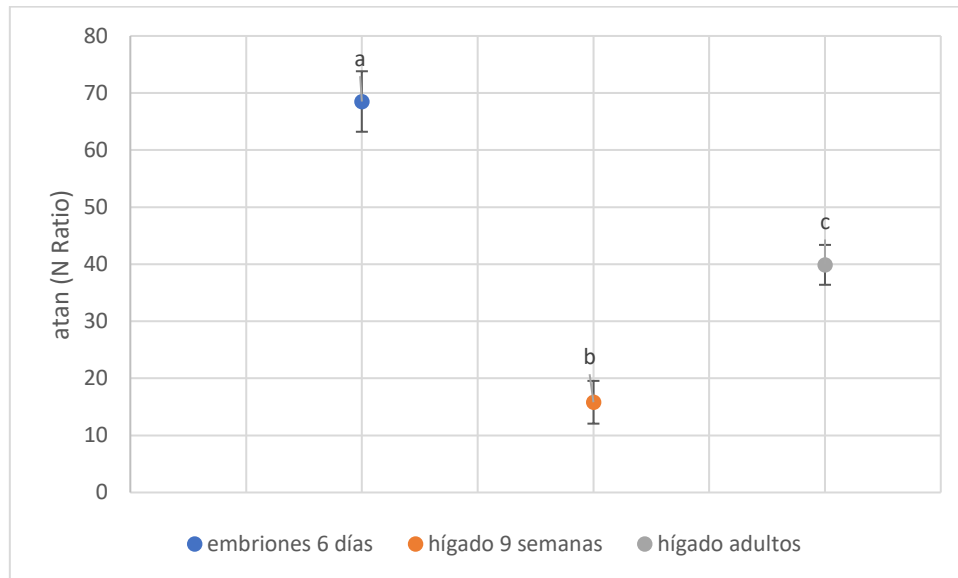


Figura 8. Gráfica de las medias de la cuantificación del gen tRNA-Leu en función del origen de las muestras.

Valores en la gráfica con diferente superíndice indican que difieren estadísticamente.

En el presente estudio se ha detectado una mayor cuantificación del gen tRNA-Leu en el grupo experimental de embriones. Los embriones necesitan una elevada cantidad de energía para poder llevar a cabo todas las divisiones celulares de forma adecuada (Fragouli *et al.*, 2015). Como se ha explicado previamente, los oocitos MII son las células que presentan mayor cantidad de mtDNA (Barritt *et al.*, 2002). Diversos estudios han asociado el elevado número de copias de esta molécula en los a una manera de asegurar la disponibilidad de suficiente energía durante el desarrollo temprano del embrión (Cagnone *et al.*, 2016). Esto es muy importante ya que la cantidad de mtDNA en embriones se mantiene invariable durante los 3 primeros días del desarrollo preimplantacional (Fragouli *et al.*, 2015). Por tanto, este aumento en las copias de mtDNA en los oocitos es necesario para satisfacer las demandas metabólicas de las primeras etapas embrionarias (Cagnone *et al.*, 2016). De hecho, además de las evidencias en humanos que apoyan la hipótesis que relaciona la infertilidad con la baja viabilidad de los oocitos por la reducida cantidad de mtDNA (de Boer *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2005; Murakoshi *et al.*, 2013; Cecchino y García-Velasco, 2018), hay estudios en los que se ha visto que, durante la maduración de los oocitos porcinos, se lleva a cabo una replicación del mtDNA hasta obtener un mínimo de copias con el fin de que estos puedan ser fecundados (Spikings *et al.*, 2007; El Shourbagy *et al.*, 2006). Por tanto, esto podría explicar porque en este estudio el grupo de embriones es el que mayor cantidad del gen tRNA-Leu presenta. Los embriones analizados este ensayo tenían 6 días por lo que, a la cantidad de mtDNA proveniente de los oocitos, se le suman las nuevas

mitocondrias resultantes de la replicación, que comienza en la etapa de blastocisto, para poder llevar a cabo el desarrollo embrionario.

En cuanto a la evolución de las mitocondrias a lo largo de la vida del animal, los resultados muestran que la cantidad de estos orgánulos se reduce a nivel postnatal si se compara con el número de estos en la etapa embrionaria. Además, en el ensayo se observa un menor número de copias de mtDNA en animales juveniles que en adultos. Diversos estudios han confirmado que la función mitocondrial disminuye durante el envejecimiento (Bratic y Larsson, 2013). Stocco *et al.* (1977) mostró en mitocondrias de hígado de rata, que la eficiencia de la cadena respiratoria disminuía hasta un 40% en animales de 24 semanas al compararlos con animales juveniles, de entre 3-4 semanas. Además, también se ha observado en estudios con ratones que, con la edad, se reducía la actividad de los complejos tanto I como IV en órganos como el hígado, cerebro o corazón (Benzi *et al.*, 1992; Lenaz *et al.*, 1997; Manczak *et al.*, 2005). Por tanto, la mayor cantidad de mtDNA en animales adultos podría tratarse de un mecanismo de compensación para normalizar la generación de energía, debido a la función mitocondrial alterada (Fragouli *et al.*, 2015).

Finalmente, se realizó el análisis de la cuantificación mitocondrial considerando tanto el grupo como el origen de la muestra. Por tanto, se analizaron los datos teniendo en cuenta los distintos grupos experimentales escogidos para este ensayo (grupo control y vitrificado en embriones a 6 días de desarrollo y en hígados de 9 semanas y 10 meses). De los diversos grupos experimentales estudiados, solo los embriones de 6 días mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el vitrificado (*Figura 9*).

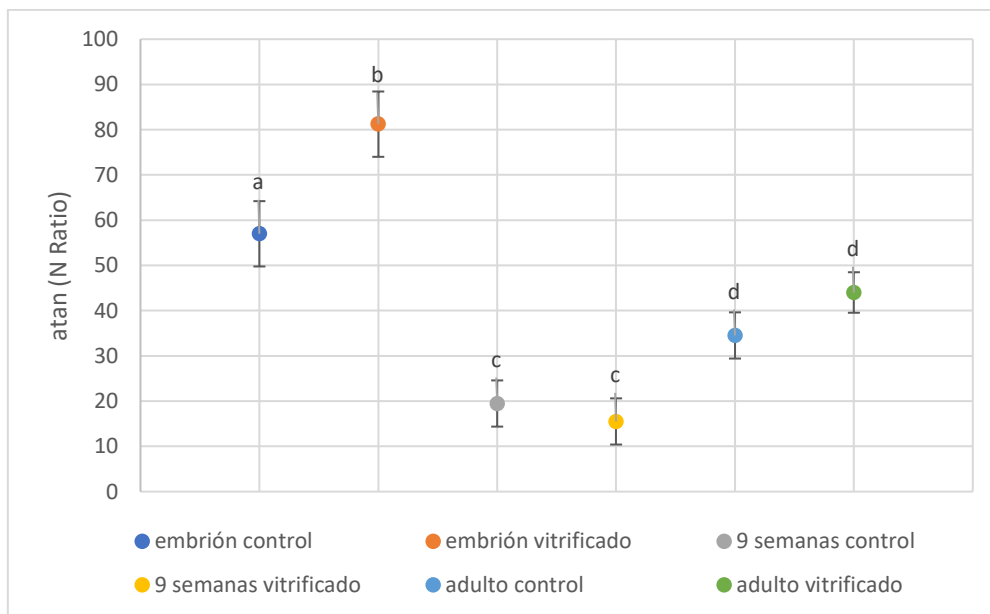


Figura 9. Gráfica de las medias de la cuantificación del gen tRNA-Leu en función del grupo experimental.

Valores en la gráfica con diferente superíndice indican que difieren estadísticamente.

Respecto a la evolución que las mitocondrias experimentan a lo largo de la vida del animal, la cantidad de mtDNA fue superior en el grupo de embriones de 6 días, disminuyó en conejos de 9 semanas, volviendo a aumentar significativamente en adultos.

Los resultados obtenidos para los embriones de 6 días, en los que se observa la cuantificación diferencial del gen tRNA-Leu, muestran que la crioconservación de embriones tiene un efecto en estos. Se ha demostrado que, en un ambiente de estrés, como es la vitrificación, el embrión puede dar lugar a cambios fenotípicos para adaptarse a las nuevas condiciones (Vrooman y Bartolomei, 2017). El efecto de las TRAs sobre el metabolismo energético ya ha sido observado en trabajos anteriores, relacionando, por ejemplo, la vitrificación de embriones con un metabolismo lipídico alterado en la placenta de fetos de conejo de 14 días (Saenz-de-Juano *et al.*, 2014) y en blastocistos bovinos (Gupta *et al.*, 2017).

A diferencia de lo observado en trabajos anteriores (Amoushahi *et al.*, 2017), la vitrificación no supuso una reducción en el número de copias de mtDNA, sino que este aumentó en los embriones del grupo vitrificado. Por otro lado, existen estudios que asocian un aumento en el número de copias de mtDNA con situaciones de estrés. Diez-Juan *et al.* (2015) comprobó esta hipótesis mediante un ensayo en el que se cultivaron embriones con 2,4-dinitrofenol, un desacoplante de la fosforilación oxidativa (Karim y Gupta, 2002) y, por tanto, un compuesto inductor de estrés energético. Los resultados mostraron que tras 48 horas el ratio mtDNA/nDNA, empleado como indicador del número de mitocondrias por célula, aumentaba (Diez-Juan *et al.*, 2015). Esto apoya la hipótesis de que el incremento del número de copias de mtDNA en embriones podría ser un indicador de que estos se encuentran en una situación de estrés metabólico (Fragouli *et al.*, 2015). Es posible que los embriones que experimentan estrés tengan mayores requerimientos energéticos. Como consecuencia, la replicación del mtDNA aumentaría con el objetivo de compensar la disminución de esta molécula debido a las sucesivas divisiones celulares (Diez-Juan *et al.*, 2015). Esto concuerda con el presente estudio, ya que la replicación del mtDNA comienza a ser significativa cuando el embrión pasa a ser blastocisto (St John *et al.*, 2010; Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2011).

De forma alternativa, la elevada cantidad de mtDNA podría estar relacionada con una función mitocondrial alterada (Fragouli *et al.*, 2015). Esta hipótesis está respaldada por la existencia de estudios que han demostrado que la crioconservación afecta a la actividad mitocondrial. Por tanto, aumentar los niveles de mtDNA también podría tratarse de un mecanismo para compensar la cantidad de mitocondrias afectadas por la vitrificación y normalizar la generación de ATP (Fragouli *et al.*, 2015). Como se comentó en la Introducción, la crioconservación puede modificar parámetros relacionados con la distribución de las mitocondrias debido a la sensibilidad que presentan estos orgánulos a los cambios de temperatura. Alteraciones en la localización mitocondrial provocan una reducción en la producción de ATP (Succu *et al.*, 2018). Asimismo, también se ha observado que la vitrificación reduce el potencial de membrana de las mitocondrias, disminuyendo la capacidad de generar ATP (Succu *et al.*, 2018).

Por último, la crioconservación incrementa la concentración intracelular de ROS (Succu *et al.*, 2018). Este aumento afecta a los complejos mitocondriales I, II y III, provocando la pérdida de su actividad y una bajada en la producción de energía (Zhang *et al.*, 2017). Por otro lado, el elevado nivel de ROS también puede alterar el número de copias de mtDNA (Ebert *et al.*, 1988). La ausencia de histonas y la proximidad del mtDNA a ROS, hacen que el genoma mitocondrial presente una elevada tasa de mutaciones (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2011; Duran *et al.*, 2011). Por tanto, si la vitrificación aumenta la concentración de ROS, el mtDNA tendrá más posibilidades de sufrir alteraciones e incrementará su concentración como mecanismo de compensación. De hecho, en el estudio llevado a cabo por Monnot *et al.* (2013), se observaron mayores niveles de mtDNA en embriones preimplantacionales humanos como respuesta a las mutaciones presentes en dicha molécula. Con los resultados de este ensayo se llegó a la hipótesis de que en

el desarrollo embrionario es necesaria una cantidad de mtDNA sin alteraciones para compensar las deficiencias energéticas causadas por el mtDNA mutado (Monnot *et al.*, 2013).

A partir del presente estudio no es posible afirmar si el aumento en la cantidad de mtDNA se debe a que la vitrificación genera en el embrión una situación de estrés que provoca un incremento de los requerimientos energéticos; a que esta técnica altera la actividad mitocondrial, y el número de mitocondrias aumenta para normalizar la producción de energía; o a una combinación de ambos mecanismos. Sin embargo, con este ensayo si se puede afirmar que la crioconservación tiene un efecto sobre las mitocondrias en estado prenatal.

Los resultados que aparecen en la *Figura 9* muestran como los embriones del grupo vitrificado presentan una mayor cantidad de mtDNA en comparación con los del grupo control, indicando que la crioconservación genera alteraciones a nivel mitocondrial. No obstante, el efecto de esta técnica solo aparece en el grupo de embriones de 6 días. García-Domínguez *et al.*, (2018) observó modificaciones en el hígado de adultos causadas por la vitrificación embrionaria temprana, alteraciones tanto en el metabolismo lipídico como en el energético, así como en el peso de los individuos y en la velocidad de crecimiento. Estas alteraciones no se han visto reflejadas en el número de mitocondrias, sugiriendo que el efecto de la vitrificación disminuye con el desarrollo del individuo hasta normalizarse y no mostrar diferencias significativas, como ocurre con los grupos de 9 semanas y adultos. Sería interesante llevar a cabo este mismo ensayo, pero incluyendo otros grupos experimentales prenatales, con el fin de comprobar si el efecto descrito se mantiene durante todo el desarrollo embrionario o si afecta principalmente a las primeras etapas y luego comienza a reducirse.

5. Conclusiones

En el presente ensayo se ha podido observar, mediante la cuantificación de tRNA-Leu y empleando el conejo como modelo animal, la evolución que las mitocondrias experimentan a lo largo de la vida de un individuo. Además, también se han mostrado los efectos que la vitrificación presenta sobre el número de copias del mtDNA tanto a nivel embrionario, como a nivel juvenil y adulto. A partir de los resultados y su discusión obtenidos se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- La cuantificación de tRNA-Leu normalizado en base a la cuantificación del gen de la histona, se ha mostrado como una técnica fiable para la cuantificación mitocondrial.
- El número de mitocondrias varía no solo de la etapa pre a la postnatal, sino también entre el estado juvenil y adulto.
- La vitrificación de embriones altera, en estado prenatal (embriones de 6 días), el número de copias de mtDNA, siendo este mayor en los embriones vitrificados frente a los controles.

6. Bibliografía

AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; MAZNI, O.A.; SCHAEFER, D.M. y RUTLEDGE, J.J. (1998). Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, 50(1), 147-162.

AMOUSHAHI, M.; SALEHNIA, M. y MOWLA, S.J. (2017). Vitrification of mouse MII oocyte decreases the mitochondrial DNA copy number, TFAM gene expression and mitochondrial enzyme activity. *J Reprod Infertil*, 18(4), 343-351.

ÁVILA-PORTILLO, L.M.; MADERO, J.I.; LÓPEZ, C.; LEÓN, M.F.; ACOSTA, L.; GÓMEZ, C.; DELGADO, L.G.; GÓMEZ, C.; LOZANO, J.M. y REGUERO, M.T. (2006). Basic points in cryopreservation. *Rev Colomb Obstet Ginecol*, 57(4), 291-300.

BARRITT, J.; KOKOT, M.; COHEN, J.; STEUERWALD, N. y BRENNER, C. (2002). Quantification of human ooplasmic mitochondria. *Reprod Biomed Online*, 4, 243–247.

BENZI, G.; PASTORIS, O.; MARZATICO, F.; VILLA, R.F.; DAGANI, F. y CURTI, D. (1992). The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the brain aging. *Neurobiol Aging*, 13(3), 361-368.

BESENFELDER, U. y BREM, G. Laparoscopic embryo transfer in rabbits. (1993). *J Reprod Fertil*, 99,53-56.

BRATIC, A. y LARSSON, N.G. (2013). The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest*, 123(3), 951-957.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLES, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J. y WITTEWER, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622.

CAGNONE, G.L.M.; TSAI, T.S.; MAKANJI, Y.; MATTHEWS, P.; GOULD, J.; BONKOWSKI, M.S.; ELGASS, K.D.; WONG, A.S.A.; WU, L.E.; MCKENZIE, M.; SINCLAIR, D.A. y ST JOHN, J.C. (2016). Restoration of normal embryogenesis by mitochondrial supplementation in pig oocytes exhibiting mitochondrial DNA deficiency. *Sci Rep*, 6(1), 1-15.

CAMPOS-CHILLÓN, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F. y SEIDEL, G.E. JR. (2006). In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology*, 65(6), 1200-1214.

CANOVAS, S.; IVANOVA, E.; ROMAR, R.; GARCÍA-MARTÍNEZ, S.; SORIANO-ÚBEDA, C.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; SAADEH, H.; ANDREWS, S.; KELSEY, G. y COY, P. (2017). DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *Elife*, 6, e23670.

CECCHINO, G.N. y GARCIA-VELASCO, J.A. (2018). Mitochondrial DNA copy number as a predictor of embryo viability. *Fertil Steril*, 111(2), 205-211.

CECCHINO, G.N.; SELI, E.; ALVES DA MOTTA, E.L. y GARCÍA-VELASCO, J.A. (2018). The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights. *Reprod Biomed Online*, 36, 686-697.

- CHAN, C.C.W.; LIU, V.W.S.; LAU, E.Y.L.; YEUNG, W.S.B.; NG, E.H.Y. y HO, P.C. (2005). Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes. *Mol Hum Reprod*, 11, 843–846.
- CHEN, M. y HEILBRONN, L.K. (2017). The health outcomes of human offspring conceived by assisted reproductive technologies (ART). *J Dev Orig Health Dis*, 8, 388–402.
- CHEN, M.; WU, L.; ZHAO, J.; WU, F.; DAVIES, M.J.; WITTERT, G.A.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. y HEILBRONN, L.K. (2014). Altered glucose metabolism in mouse and humans conceived by IVF. *Diabetes*, 63, 3189–3198.
- CHEN, T.B.; XUN, Z.; LIN, J.P.; LIU, C.; FU, Y.; WU, W.N.; FU, X.C.; HU, Y.H. y OU, Q.S. (2017). Real-time PCR for quantitative detection of mitochondrial DNA from peripheral blood mononuclear cell in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Med*, 10(3), 5629–5636.
- CORTELL, C.; VICENTE, J.S.; MOCÉ, E.; MARCO-JIMÉNEZ, F. y VIUDES DE CASTRO, M. (2010). Efficiency of repeated in vivo oocyte and embryo recovery after rhFSH treatment in rabbits. *Reprod Domes Anim*, 45(1), 155–159.
- CUNNINGHAM, J. (2017). Infertility: a primer for primary care providers. *JAAPA*, 30(9), 19–25.
- DAI, J.; WU, C.; MUNERI, C.W.; NIU, Y.; ZHANG, S.; RUI, R. y ZHANG, D. (2015). Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. *Cryobiology*, 71, 291–298.
- DE BOER, K.; JANSEN, R.; LEIGH, D. y MORTIMER, D. (1999). Quantification of mtDNA copy number in the human secondary oocyte. *Hum Reprod*, 14, 2419.
- DIEZ-JUAN, A.; RUBIO, C.; MARIN, C.; MARTINEZ, S.; AL-ASMAR, N. y RIBOLDI, M. (2015). Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertil Steril*, 104(3), 534–541.
- DONJACOUR, A.; LIU, X.; LIN, W.; SIMBULAN, R. y RINAUDO, P.F. (2014). In Vitro fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model. *Biol Reprod*, 90(4), 1–10.
- DUMOULIN, J.C.; LAND, J.A.; VAN MONTFOORT, A.P.; NELISSEN, E.C.; COONEN, E.; DERHAAG, J.G.; SCHREURS, I.L.; DUNSELMAN, G.A.; KESTER, A.D.; GERAEDTS, J.P. y EVERS, J.L. (2010). Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod*, 25(3), 605–612.
- DURAN, H.E.; SIMSEK-DURAN, F.; OEHNINGER, S.C.; JONES, H.W. JR. y CASTORA F.J. (2011). The association of reproductive senescence with mitochondrial quantity, function, and DNA integrity in human oocytes at different stages of maturation. *Fertil Steril*, 96, 384–388.
- EBERT, K.M.; LIEM, H. y HECHT, N.B. (1988). Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo. *J Reprod Fertil*, 82(1), 145–149.
- ECKER, D.J. STEIN, P.; XU, Z.; WILLIAMS, C.J.; KOPF, G.S.; BILKER, W.B.; ABEL, T. y SCHULTZ, R.M. (2004). Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc Natl Acad Sci*, 101(6), 1595–1600.
- EICHENLAUB-RITTER, U.; WIECZOREK, M.; LÜKE, S. y SEIDEL, T. (2011). Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion*, 11(5), 783–796.

- EL SHOURBAGY, S.H.; SPIKINGS, E.C.; FREITAS, M. y ST JOHN, J.C. (2006). Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*, 131(2), 233–245.
- EMILIANI, S.; VAN DEN BERGH, M.; VANNIN, A.S.; BIRAMANE, J. y ENGLERT, Y. (2000). Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod*, 15(4), 905–910.
- ENGELMANN, F. (2000). Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application, en: *Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources*. IPGRI, 8-20.
- FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A. y MERYMAN, H.T. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21(4), 407–426.
- FERNÁNDEZ, A.; GONZALVO, M.C.; CLAVERO, A.; RUIZ-DE-ASSÍN, R.; ZAMORA, S.; ROLDÁN, M.; RABELO, B.; RAMÍREZ, J.P.; YOLDI, A. y CASTILLA, J.A. (2009). Bases of sperm cryobiology applied for sperm banks. *ASEBIR*, 14(1), 17-25.
- FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P.; BILBAO, A.; JIMÉNEZ, A.; PÉREZ-CRESPO, M.; RAMÍREZ, M.A.; RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; PINTADO, B. y GUTIÉRREZ-ADÁN, A. (2004). Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci*, 101(16), 5880–5885.
- FEUER, S.K. y RINAUDO, P.F. (2017). Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of in vitro fertilization (IVF) in the mouse. *J Dev Orig Health Dis*, 8, 403-410.
- FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIEBAHN, C.; NAVARRETE-SANTOS, A. y DURANTHON, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1), 1-10.
- FLEMING, T.P.; VELAZQUEZ, M.A. y ECKERT, J.J. (2015). Embryos, DOHaD and David Barker. *J Dev Orig Health Dis*, 6, 377-383.
- FOOTE, R.H. y CARNEY, E.W. (2000). The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. *Reproductive Toxicol*, 14, 477–493.
- FORDYCE, J.A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J Exp Biol*, 209, 2377–2383.
- FORSMAN, A. (2015). Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity (Edinb)*, 115, 276-284.
- FRAGOULI, E.; SPATH, K.; ALFARAWATI, S.; KAPER, F., CRAIG, A.; MICHEL, C.E.; KOKOCINSKI, F.; COHEN, J.; MUNNE, S. y WELLS, D. (2015). Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential. *PLOS Genetics*, 11(6), e1005241.
- FRAGOULI, E. y WELLS, D. (2015). Mitochondrial DNA assessment to determine oocyte and embryo viability. *Semin Reprod Med*, 33, 401-409.
- GAO, D. y CRITSER, J.K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J*, 41, 187–196.
- GARCÍA-DOMÍNGUEZ, X.; PEÑARANDA, D.S.; ESTRUCH, G.; BLANCA, J.; GARCÍA-CARPINTERO, V.; CAÑIZARES, J.; MARCO-JIMÉNEZ, F. y VICENTE, J.S. (2018). Long-term phenotypic effects following vitrified-thawed embryo transfer in a rabbit model. *bioRxiv*.

- GISSI, C.; GULLBERG, A. y ARNASON, U. (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Genomics*, 50, 161-169.
- GRAFODATSKAYA, D.; CYTRYNBAUM, C. y WEKSBERG, R. (2013). The health risks of ART. *EMBO Reports*, 14(2), 129-410.
- GUPTA, A.; SINGH, J.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; DIAS, FCF. y ANZAR, M. (2017). Transcriptomic difference in bovine blastocysts following vitrification and slow freezing at morula stage. *PLoS One*, 12, e0187268.
- HARCOURT-BROWN F.M. (2017). Disorders of the reproductive tract of rabbits. *Vet Clin Exot Anim*, 20, 555–587.
- HORI, A.; YOSHIDA, M.; SHIBATA, T. y LING, F. (2009). Reactive oxygen species regulate DNA copy number in isolated yeast mitochondria by triggering recombination-mediated replication. *Nucleic Acids Res*, 37(3), 749-761.
- INHORN, M.C. y PATRIZIO, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*, 21(4), 411–426.
- JANG, T.H.; PARK, S.C.; YANG, J.H.; KIM, J.Y.; SEOK, J.H.; PARK, U.S.; CHOI, C.W.; LEE, S.R. y HAN, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res*, 6(1), 12–18.
- JING, Y.; LI, L.; LI, Y.Y.; OUYANG, Y.C.; SUN, Q.Y.; ZHANG, C.L. y LI, R. (2018). Embryo quality, and not chromosome nondiploidy, affects mitochondrial DNA content in mouse blastocysts. *J Cell Physiol*, 234(7), 10481-10488.
- KARIM, K. y GUPTA, S.K. (2002). Effect of alter-native carbon source on biological transformation of nitrophenols. *Biodegradation*, 13, 353-360.
- KASAI, M. (1997). Vitrification: Refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. *J Mamm Ova Res*, 14, 17-28.
- KASAI, M.; HAMAGUCHI, Y.; ZHU, T.S.E.; MIYAKE, T.; SAKURAI, T. y MACHIDA, T. (1992). High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-base solution by a simple method. *Biol Reprod*, 46, 1042-1046.
- KHAN ACADEMY. Visto el 26 de Mayo del 2019, <https://es.khanacademy.org/science/biology/cellular-respiration-and-fermentation/oxidative-phosphorylation/a/oxidative-phosphorylation-etc>
- KLEIJKERS, S.H.; VAN MONTFOORT, A.P.; SMITS, L.J.; VIECHTBAUER, W.; ROSEBOOM, T.J.; NELISSEN, E.C.; COONEN, E.; DERHAAG, J.G.; BASTINGS, L.; SCHREURS, I.E.; EVERS, J.L. y DUMOULIN, J.C. (2014). IVF culture medium affects post-natal weight in humans during the first 2 years of life. *Hum Reprod*, 29, 661-669.
- LAVARA, R.; BASELGA, M.; MARCO-JIMÉNEZ, F. y VICENTE, J.S. (2015). Embryo vitrification in rabbits: Consequences for progeny growth. *Theriogenology*, 84(5), 674–680.
- LAZO-JAVALERA, M.F.; ASTORGA-CIENFUEGOS, K.R.; TIZNADO-HERNÁNDEZ, M.E.; VARGAS-ARISPURO, I.C.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M.A.; ISLAS-OSUNA, M.A.; HERNÁNDEZ-OÑATE, M.A.; MARTÍNEZ-MONTERO, M.E. y RIVERA-DOMÍNGUEZ, M. (2017). Efecto de los crioprotectores en

la morfología y pérdida iónica en yemas axilares de vid cv. 'Flame Seedless' criopreservadas. *Investigación y Ciencia*, 25(72).

LENAZ, G.; BOVINA, C.; CASTELLUCCIO, C.; FATO, R.; FORMIGGINI, G. y GENOVA, M.L. (1997). Mitochondrial complex I defects in aging. *Mol Cell Biochem*, 174(1-2), 329-333.

MANCZAK, M.; JUNG, Y.; PARK, B.S.; PARTOVI, D. y REDDY, PH. (2005). Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J Neurochem*, 92(3), 494-504.

MANDAWALA, A.A.; HARVEY, S.C.; ROY, T.K. y FOWLER, K.E. (2016). Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, 86, 1637–1644.

MAPARA, M.; THOMAS, B.S. y BHAT, K.M. (2012). Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J*, 9(1), 111-118.

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. *Repro Domest Anim*, 45(5), 118-123.

MARCO-MEDINA, A. y SERRANO-MARTÍNEZ, F. (2012). Criopreservación: herramienta para la conservación ex situ de material vegetal. *Cuadernos de Biodiversidad*, 38, 9-12.

MAZUR, P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*, 47, 347–369.

MONNOT, S.; SAMUELS, D.C.; HESTERS, L.; FRYDMAN, N.; GIGAREL, N. y BURLET, P. (2013). Mutation dependence of the mitochondrial DNA copy number in the first stages of human embryogenesis. *Hum Mol Gen*, 22(9), 1867–1872.

MORAES, C.T.; RICCI, E.; BONILLA, E.; DIMAURO, S. y SCHON, E.A. The mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. (1992). *Am J Hum Genet*, 50(5), 934-949.

MURAKOSHI, Y.; SUEOKA, K.; TAKAHASHI, K.; SATO, S.; SAKURAI, T.; TAJIMA, H. y YOSHIMURA, Y. (2013). Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. *J Assist Reprod Genet*, 30, 1367–1375.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). MT-TL1 gene, visto el 25 de Mayo del 2019, <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-TL1#>

PFAFFL, M.W. (2004). Quantification Strategies in Real-Time PCR, en: *A-Z of Quantitative PCR*. Ed. S.A. Bustin. International University Line, 87-112.

PÜSCHEL, B.; DANIEL, N.; BITZER, E.; BLUM, M.; RENARD, J.P. y VIEBAHN, C. (2010). The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): a model for mammalian reproduction and early embryology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

QUIROS, P.M.; GOYAL, A.; JHA, P. y AUWERX, J. (2017). Analysis of mtDNA/nDNA ratio in mice. *Curr Protoc Mouse Biol*, 7(1), 47-54.

ROCHE. (2001). LightCycler. Relative Quantification. Technical Note No. LC 13/2001.

ROONEY, J.P.; RYDE, I.T.; SANDERS, L.H.; HOWLETT, E.H.; COLTON, M.D.; GERM, K.E.; MAYER, G.D.; GREENAMYRE, J.T. y MEYER, J.N. (2015). PCR based determination of mitochondrial DNA copy number in multiple species. *Methods Mol Biol*, 1241, 23–38.

RUI, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4(1), 177-197.

SAENZ-DE-JUANO, M.D.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; SCHMALTZ-PANNEAU, B.; JIMÉNEZ-TRIGOS, E.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; PEÑARANDA, D.S.; JOUNEAU, L.; LECARDONNEL, J.; LAVARA, R.; NATURIL-ALFONSO, C.; DURANTHON, V. y VICENTE, J.S. (2014). Vitrification alters rabbit foetal placenta and transcriptomic and proteomic level. *Reproduction*, 147, 789-801.

SAENZ-DE-JUANO, M.D.; PEÑARANDA, D.S.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; LLOBAT, L. y VICENTE, J.S. (2011). Differential mRNA Expression in Rabbit In vivo Pre-implantatory Embryos. *Reprod Dom Anim*, 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(1), 69.

SÁNCHEZ-ALVARADO, A. y YAMANAKA, S. (2014). Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell*, 157, 110–119.

SATO, M. y SATO, K. (2011). Degradation of paternal mitochondria. *Science*, 37, 1141–1144.

SCOTT, K.A.; YAMAZAKI, Y.; YAMAMOTO, M.; LIN, Y.; MELHORN, S.J.; KRAUSE, E.G.; WOODS, S.C.; YANAGIMACHI, R.; SAKAI, R.R. y TAMASHIRO, K.L. (2010). Glucose parameters are altered in mouse offspring produced by assisted reproductive technologies and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 83(2), 220–227.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A. y TROUNSON, A.O. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53(1), 59-72.

SONG, S.; GHOSH, J.; MAINIGI, M.; TURAN, N.; WEINERMAN, R.; TRUONGCAO, M.; COUTIFARIS, C. y SAPIENZA, C. (2015). DNA methylation differences between in vitro- and in vivo-conceived children are associated with ART procedures rather than infertility. *Clin Epigenetics*, 7, 41.

SPARKS, A.E. (2015). Human embryo cryopreservation—methods, timing, and other considerations for optimizing an embryo cryopreservation program. *Semin Reprod Med*, 33, 128–144.

SPIKINGS, E.C.; ALDERSON, J. y JOHN, J.C.S. (2007). Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol Reprod*, 76(2), 327–335.

ST JOHN, J.C.; FACUCHO-OLIVEIRA, J.; JIANG, Y.; KELLY, R. y SALAH, R. (2010). Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update*, 16(5), 488-509.

STOCCO, D.M.; CASCARANO, J. y WILSON, M.A. (1977). Quantitation of mitochondrial DNA, RNA, and protein in starved and starved-refed rat liver. *J Cell Physiol*, 90(2), 295–306.

SUCCU, S.; GADAU, S.D.; SERRA, E.; ZINELLU, A.; CARRU, C.; PORCU, C.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F. y LEONI, G.G. (2018). A recovery time after warming restores mitochondrial

- function and improves developmental competence of vitrified ovine oocytes. *Theriogenology*, 110, 18-26.
- SUTOVSKY, P.; MORENO, R.D.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; SIMERLY, C. y SCHATTEN, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402, 371-372.
- SVEC, D.; TICHOPAD, A.; NOVOSADOVA, V.; PFAFFL, M.W. y KUBISTA, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*, 3, 9–16.
- TROUNSON, A. y MOHR, L. (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305, 707–709.
- VAN DEN OUWELAND, J.M.; LEMKES, H.H.; RUITENBEEK, W.; SANDKUIJL, L.A.; DE VIJLDER, M.F.; STRUYVENBERG, P.A.; VAN DE KAMP, J.J. y MAASSEN, J.A. (1992). Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet*, 1(5), 368–371.
- VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; MARCO-JIMÉNEZ, F. y VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administrated in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76(6), 1120-1125.
- VICENTE, J.S.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. y GARCÍA, M.L. (1999). In vivo survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein. *Reprod Nutr Dev*, 39, 657-662.
- 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. *Reprod Domes Anim*.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P. y VICENTE, J.S. (1997). Effect of sperm count on the fertility and prolificity rates of meat rabbits. *Anim Reprod Sci*, 46(3-4), 313-319.
- VROOMAN, L.A. y BARTOLOMEI, M.S. (2017). Can assisted reproductive technologies cause adult-onset disease? Evidence from human and mouse. *Reprod Toxicol*, 68, 72-84.
- WATKINS, A.J.; PLATT, D.; PAPENBROCK, T.; WILKINS, A.; ECKERT, J.J.; KWONG, W.Y.; OSMOND, C.; HANSON, M. y FLEMING, T.P. (2007). Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proc Natl Acad Sci*, 104(13), 5449–5454.
- WHITMAN, D.W. y AGRAWAL, A.A. (2009). What is phenotypic plasticity and why is it important?, en: *Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences*. Science Publishers: Enfield, 1–63.
- WOLFFE, A.P. y MATZKE, M.A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science*, 286, 481-486.
- WONG, K.M.; MASTENBROEK, S. y REPPING, S. (2014). Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril*, 102, 19-26.
- YAVIN, S. y ARAV, A. (2007). Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, 67, 81–89.
- ZEILMAKER, G.H.; ALBERDA, A.T.; VAN GENT, I.; RIJHMANS, C.M. y DROGENDIJK, A.C. (1984). Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril*, 42, 293–296.

ZHANG, H.; LI, Y.; SU, W.; YING, Z.; ZHOU, L.; ZHANG, L. y WANG, T. (2017). Resveratrol attenuates mitochondrial dysfunction in the liver of intrauterine growth retarded suckling piglets by improving mitochondrial biogenesis and redox status. *Mol Nutr Food Res*, 61(5), 1-12.

ZHANG, Q.; WANG, J.; DENG, F.; YAN, Z.; XIA, Y.; WANG, Z.; YE, J.; DENG, Y.; ZHANG, Z.; QIAO, M.; LI, R.; DENDULURI, S.K.; WEI, Q.; ZHAO, L.; LU, S.; WANG, X.; TANG, S.; LIU, H.; LUU, H.H.; HAYDON, R.C.; HE, T.C. y JIANG, L. (2015). TqPCR: a touchdown qPCR assay with significantly improved detection sensitivity and amplification efficiency of SYBR Green qPCR. *PLOS ONE*, 10(7), e0132666.

ZHANG, W.; LIU, Y.; AN, Z.; HUANG, D.; QI, Y. y ZHANG, Y. (2011). Mediating effect of ROS on mtDNA damage and low ATP content induced by arsenic trioxide in mouse oocytes. *Toxicol In Vitro*, 25(4), 979-984.