



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

COMPARACIÓN DE LA TASA DE BLASTULACIÓN DE
EMBRIONES CULTIVADOS EN GRUPO Y EN
SOLITARIO EN EL MODELO CONEJO

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Tomás Rico, Ismael

Tutor/a: Marco Jiménez, Francisco

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

COMPARACIÓN DE LA TASA DE BLASTULACIÓN DE EMBRIONES CULTIVADOS EN GRUPO Y EN SOLITARIO EN EL MODELO CONEJO

TRABAJO DE FIN DE GRADO



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

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

Grado en Biotecnología

Alumno: Ismael Tomás Rico

Tutor: D. Francisco Marco Jiménez

Valencia, Julio 2022.

Título del TFG:

Comparación de la tasa de blastulación de embriones cultivados en grupo y en solitario en el modelo conejo.

Alumno: Ismael Tomás Rico

Tutor académico: D. Francisco Marco Jiménez

Valencia, Julio 2022

RESUMEN

El desarrollo de la inteligencia artificial en embriología mediante la aplicación de la tecnología *time-lapse imaging* está produciendo una transición al cultivo individualizado, ya que otorga la capacidad de seleccionar el embrión más idóneo para ser transferido. No obstante, una de las dudas actuales de la comunidad científica es que el cultivo *in vitro* en la reproducción humana se realice de forma individual, dado que la mayoría de los ensayos realizados indican que los resultados del cultivo en grupo parecen ser más ventajosos en cuanto a desarrollo y calidad de los embriones obtenidos. La mayoría de estudios se han basado en ensayos en el modelo murino, pese a no ser el modelo animal más adecuado para los estudios de embriología y biología reproductiva. Existen modelos más similares a la reproducción humana a partir de los cuales poder extrapolar resultados, como es el conejo, sin embargo, bajo nuestro conocimiento, no se ha estudiado el cultivo *in vitro* de forma individualizada.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto del cultivo embrionario *in vitro*, de forma individualizada o en grupo, sobre el desarrollo *in vitro* y sobre la capacidad de implantación y nacimiento empleando el modelo conejo. Para ello, se emplearon 10 hembras nulíparas como donantes, obteniéndose 409 embriones. Los embriones fueron situados en condiciones de cultivo, en grupo (n=10) o de forma individualizada (n=1), y mantenidos durante 72 horas. Transcurrido este periodo se evaluó el desarrollo y se procedió a la transferencia de aquellos que habían alcanzado el estadio de blastocisto (n= 200) a 10 hembras receptoras, mediante laparoscopia. La valoración de la implantación embrionaria se realizó mediante laparoscopia a los 12 días de gestación. Finalmente, el día del parto se determinó el número de animales nacidos. El cultivo *in vitro* de embriones de forma individualizada presentó diferencias significativas respecto del cultivo en grupo. En concreto, la tasa de blastulación de los embriones cultivados de forma individualizada fue superior (+12,6%) a la de aquellos cultivados en grupo (P= 0,03). En cuanto al desarrollo *in vivo*, no se apreciaron diferencias significativas (P= 0,881) ni en la tasa de implantación (33% vs 34%, para individual y en grupo, respectivamente) ni en la tasa de nacimientos (20% vs 25%, para individual y en grupo, respectivamente) de ambos grupos experimentales. Por todo ello, nuestros resultados demuestran que, el modelo conejo es ideal para llevar a cabo estudios en los que se requiera el desarrollo de embriones tempranos *in vitro* individualizados, dado que estos no presentan ninguna diferencia de desarrollo ni *in vitro* ni *in vivo*.

PALABRAS CLAVE

Blastocisto, superovulación, cultivo *in vitro*, desarrollo embrionario.

Title:

Blastulation rate comparison of embryos cultivated in group and individually in the rabbit model

ABSTRACT

The development of artificial intelligence in embryology through the application of time-lapse imaging technology is making a transition to individualized culture since it provides the ability to select the most suitable embryo to be transferred. Nevertheless, one of the current doubts of the scientific community is that in vitro culture in human is carried out individually, given that most of the studies carried out indicate that the results of group culture seem to be more advantageous in terms of embryo development and quality. Most studies have been based on tests in the murine model, despite its not being the most suitable animal model for embryology and reproductive biology studies. There are models more similar to human reproduction from which results can be extrapolated, such as the rabbit, however, to our knowledge, in vitro culture has not yet been studied individually on this model.

The objective of this work has been to evaluate the effect of in vitro embryo culture, individually or in groups, on in vitro development and on the capacity for implantation and birth using the rabbit model. For this, 10 nulliparous females were used as donors, obtaining 409 embryos. The embryos were placed in culture conditions, in groups (n=10) or individually (n=1), and maintained for 72 hours. After this period, development was evaluated and those that had reached the blastocyst stage (n=200) were transferred to 10 recipient females by laparoscopy. The assessment of embryonic implantation was performed by laparoscopy at day 12 of gestation. Finally, after birth, the number of animals born was determined. The individually in vitro culture presented significant differences when compared to group culture. Specifically, the blastulation rate of embryos cultured individually was higher (+12.6%) than that of group cultured (P= 0.03). Regarding in vivo development, no significant differences were observed (P= 0.881) neither in the implantation rate (33% vs 34%, for individual and in group, respectively) nor in the birth rate (20% vs 25%, for individual and in group, respectively) of both experimental groups. For all these reasons, our results indicate that the rabbit model is ideal for carrying out studies that require the use of individualized in vitro culture for early embryos, since these do not present any difference in development neither in vitro nor in vivo.

KEY WORDS

Blastocyst, superovulation, in vitro culture, embryo development.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar las gracias a todas las personas con las que he compartido estos cuatro años de carrera, sin las cuales no podría haber llegado aquí.

Por otro lado, dar las gracias a Paco, mi tutor y maestro de varias asignaturas durante la carrera. Da gusto aprender de alguien que sabe mucho y transmite tanta seguridad en toda aquella materia que imparte. Estas semanas se me han pasado volando, me he divertido, y estaba siempre con ganas de ir a hacer TFG, y gran parte de eso se debe a la atmósfera que creáis tú y tus compañeros. Gracias por enseñarme tanto.

A José Vicente, que fue al primero del departamento que pedí ayuda para hacer el TFG, y que no dudó en ayudarme y buscar una solución para que pudiera realizarlo en ese ámbito, además de ayudarnos con las transferencias, una cosa que es más fácil ver que hacer. Siempre amable y con ganas de explicar todas las dudas que me surgían. Las asignaturas de este departamento siempre me llamaron la atención, pero no habrían sido las mismas sin unos maestros que las expusieran con esas ganas y conocimiento.

A Ion, que los ratos que he estado con él, siempre me ha aconsejado, dentro y fuera del TFG, además de no perder una oportunidad para corregirme y hacerme mejorar con pequeños detalles.

A mis compañeros de la carrera, especialmente a mi amigo Quique, que en los primeros años de carrera en los que iba muy despistado era mi agenda personal, además de ser mucho más responsable y siempre tener que explicarme aquello que no sabía. También por las bravas de la cantina de artes, que son de las cosas que primero se me vienen a la cabeza pensando en la carrera.

A Hugo, Alonso, Vanessa y Raúl, que han hecho que estos años se pasaran rápido y pueda decir que me llevo varios amigos de esta experiencia.

También agradecer a mis padres, que, aunque no sepan mucho de lo que va la carrera y tampoco les cuente muchas cosas, me han permitido poder realizarla, costeando todo y dándome una educación, que es lo que más aprecio de todas las cosas que me han dado.

A mis amigos de toda la vida, con los que me despejo los fines y hago los planes de fiesta y escapadas. Gracias por llevar más tiempo del que recuerdo conmigo, hemos vivido muchas experiencias juntos, espero que solo sean el prólogo de una historia aún mejor.

A A. Vilatela y Jonás, que me han ayudado a poder acabar la carrera, en el momento que peor he estado física y anímicamente. Personas con la pasión que tienen ellos por su trabajo hacen que nada pueda salir mal.

A María, que lleva conmigo desde que empezamos la carrera, y sabe de lo que soy capaz, por eso no me deja que me relaje y siempre me recuerda que me ponga las pilas. Eres la que más me conoce y con la única que he compartido mis peores momentos, gracias por estar siempre ahí.

Por último, a mí mismo, por escoger el camino que quería, aunque no fuera el más fácil, y por siempre saber que lo iba a conseguir independientemente del esfuerzo que conllevara. Son las cosas que más cuestan las que te dan una mayor satisfacción cuando las consigues.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. Diseño experimental.....	7
3.2. Animales.....	8
3.3. Obtención de embriones.....	8
3.4. Cultivo <i>in vitro</i>	9
3.5. Evaluación del cultivo <i>in vitro</i>	10
3.6. Transferencia de embriones.....	10
3.7. Evaluación de la tasa de implantación y de la tasa de natalidad.....	11
3.8. Análisis estadístico.....	11
4. RESULTADOS	13
4.1. Efecto del cultivo embrionario <i>in vitro</i> en grupo y en solitario en la tasa de blastulación, implantación y natalidad.....	13
5. DISCUSIÓN	14
6. CONCLUSIÓN	16
7. BIBLIOGRAFÍA	17

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Imagen de embriones cultivados *in vitro* y equipo de tecnología *time-lapse imaging*.
- **Figura 2.** Diseño experimental.
- **Figura 3.** Embriones de conejo en estadio de cigoto y dos células, obtenidos mediante perfusión de oviducto a las 24 horas de la IA.
- **Figura 4.** A) Embrión de 72 horas de cultivo *in vitro* cultivado en solitario. B) Embriones de 72 horas de cultivo *in vitro* cultivados en grupo.
- **Figura 5.** A) Implantación embrionaria. B) Gazapos recién nacidos.

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Efecto del cultivo embrionario *in vitro* en grupo y en solitario en el desarrollo *in vitro* en el modelo conejo.
- **Tabla 2.** Efecto del cultivo embrionario *in vitro* en grupo y en solitario en el desarrollo *in vivo* en el modelo conejo.

ABREVIATURAS

- **TRA**= Técnicas de reproducción asistida.
- **IA**= Inseminación artificial.
- **CIV**= Cultivo *in vitro*.
- **GnRH**= Hormona liberadora de gonadotropinas.
- **H.P.C.** = Horas post-coito.
- **FSH-CTP** = FSH de larga duración, Corifolitropina alfa.

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida empezaron a ser estudiadas hace poco menos de un siglo, lográndose en 1969 el primer embrión humano fecundado *in vitro* y su posterior desarrollo hasta blastocisto (Edwards *et al.*, 1970; Steptoe *et al.*, 1971). A raíz de este hecho histórico se formaron dos corrientes; (i) la de aquellos que veían esta nueva ciencia como un avance para ayudar a personas con problemas de fertilidad, y (ii) la de aquellos que estaban éticamente en contra por ser considerada una práctica totalmente inmoral (Johnson, 2019). Científicos como Edwards, Steptoe y Purdy, tuvieron que hacer frente a los problemas éticos de la época, además de a los problemas técnicos que conllevaba dar el siguiente gran paso, lograr el nacimiento de un bebé procedente de un embrión fecundado *in vitro*. Entre las barreras técnicas que retrasaron este hito se encontraba el desarrollo de un medio de cultivo *in vitro* apto para el desarrollo embrionario, y que permitiese su implantación (Johnson, 2019). No obstante, en 1978 nació Louise Brown, la primera niña probeta (Edwards y Steptoe, 1978). Tras este hito hace más de 40 años, hoy en día son millones los bebés nacidos gracias a las técnicas de reproducción asistida (TRA), las cuales han ido creciendo hasta llegar a cifras de 400,000 bebés al año (Adamson *et al.*, 2018, Niederberger *et al.*, 2018). Sin embargo, pese a que este campo de estudio ha sido optimizado pasando de tasas de implantación inferiores al 5% hasta superar el 50% en la actualidad, aún siguen necesitándose en muchas situaciones más de un ciclo de tratamiento para lograr el embarazo (Niederberger *et al.*, 2018). Es por ello que se sigue requiriendo de I +D+I para lograr mejorar cada aspecto relacionado con el desarrollo óptimo de los embriones *in vitro*. De todos los factores, uno de los más importantes es disponer de medio de cultivo adecuado, el cual sea capaz de suplir todas las necesidades del embrión y fomentar su avance. En 1929, Lewis y Gregory estudiaron el desarrollo embrionario *in vitro* del modelo conejo, empleando plasma (Lewis y Gregory, 1929), siendo en 1947 cuando se consiguió cultivar y transferir embriones de conejo generando descendencia (Chang, 1947). Posteriormente, se descubrió que el entorno del embrión cambiaba con el transcurso de los días en el interior del tracto reproductivo, modificándose las concentraciones de los nutrientes en cada tramo, lo cual llevó al desarrollo de los medios de cultivo secuenciales (Chatot *et al.*, 1989; Gardner, 1994; Gardner y Lane, 1997; Hentemann y Bertheussen, 2009). Hoy en día, el uso de los medios de cultivo secuenciales se emplea con frecuencia, si bien, no hay evidencia suficiente que certifique su superioridad frente a los medios continuos (Basile *et al.*, 2013; Summers *et al.*, 2013). En este sentido, la introducción de la tecnología *time-lapse imaging* en un cultivo cerrado ha puesto el interés en medios de cultivo continuos que sean capaces de desarrollar el embrión durante todo el período *in vitro* (Lundin y Park, 2020). Algunos autores describen que el cultivo ininterrumpido

presenta ventajas a la hora de seleccionar los mejores embriones (Meseguer *et al.*, 2011, 2012). No obstante, pese a todos los avances en la mejora de los medios de cultivo, y en la incorporación de nutrientes y factores de crecimiento específicos, aún no se dispone de un medio de cultivo estándar para el cultivo *in vitro* de embriones humanos, debido principalmente a la falta de consenso entre las grandes empresas, no conociéndose la concentración exacta de cada componente (Chronopolou y Harper, 2015).

Por otro lado, el desarrollo de la inteligencia artificial en embriología mediante la aplicación de la tecnología *time-lapse imaging* está produciendo una transición al cultivo individualizado (Figura 1).

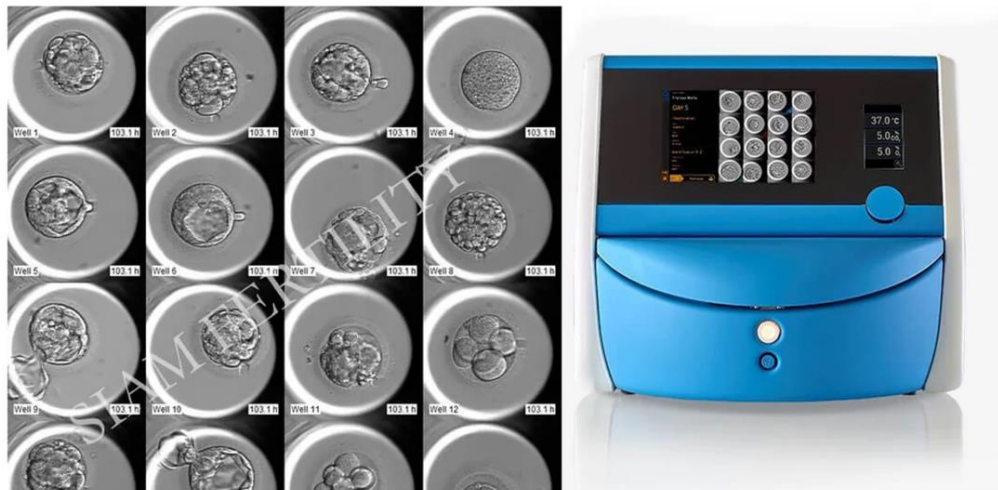


Figura 1. Imagen de embriones cultivados *in vitro* y equipo de tecnología *time-lapse imaging*.

El uso de esta tecnología para el cultivo *in vitro* presenta ventajas y desventajas. En cuanto a las ventajas, la primera de ellas es la capacidad de monitorizar de forma visual el patrón de división del embrión a lo largo del desarrollo, lo que proporciona información del embrión más idóneo para ser transferido (Lundin y Park, 2020). Otra ventaja es la disponibilidad del medio de cultivo, donde se encuentran restos celulares del embrión susceptibles de ser empleados para realizar análisis genéticos preimplantacionales y detectar ciertas enfermedades monogénicas sin afectar directamente al mismo (Greco *et al.*, 2020). Por último, tenemos que tener en cuenta que empleando esta técnica de cultivo cerrado se emplean medios continuos que poseen todos los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario, consumiéndose los pertinentes en cada etapa dependiendo de las necesidades de la misma (Lundin y Park, 2020). De esta forma se interfiere lo mínimo, evitando alteraciones por la manipulación. Por lo que respecta a las desventajas, la principal es la menor tasa de blastulación y calidad embrionaria, al

ser un cultivo individualizado (Dai *et al.*, 2012; Wydooghe *et al.*, 2014; Lehner *et al.*, 2017). A pesar de que la especie humana produce un embrión en cada ciclo, parece ser que la densidad embrionaria *in vitro* juega un papel importante en la capacidad de desarrollo. Al aumentarse el número de embriones se incrementa la concentración de componentes autocrinos (vesículas extracelulares), que actúan como factores de crecimiento para sí mismos y para los embriones vecinos (función paracrina), siendo perjudiciales en exceso (Lehner *et al.*, 2017).

Así, una de las dudas actuales de la comunidad científica es que el cultivo *in vitro* en la reproducción humana se realice de forma individual dado que la mayoría de los ensayos indican que los resultados del cultivo en grupo parecen ser más ventajosos (Kelley y Gardner, 2019). Son varios los estudios llevados a cabo en varios modelos animales como el ratón o el bovino, en los que se indican que al igual que en humano, el cultivo embrionario en grupo presenta mejoras en el desarrollo (Dai *et al.*, 2012; Wydooghe *et al.*, 2014; Lehner *et al.*, 2017). Así, en ratón, se observa que el cultivo individualizado implica una menor tasa de blastulación, con embriones que presentan un menor número de células (Dai *et al.*, 2012). También se ha descrito su influencia sobre el metabolismo relacionado con la glucosa y los aminoácidos, si bien este efecto parece corregirse en la etapa fetal, igualándose el peso de los gazapos nacidos a partir de embriones cultivados de forma individual y en grupo (Kelley y Gardner, 2019). Resaltar que se ha descrito que reduciendo el volumen de cultivo de 20 μL a 2 μL , y empleando medio condicionado, los resultados del cultivo individualizado mejoran, acercándose a lo observado para el cultivo en grupo (Kelley y Gardner, 2017). En cuanto a los ensayos realizados en bovino, el *cultivo in vitro* en grupo también se ha mostrado superior al individualizado en tasa de blastulación y calidad embrionaria (Wydooghe *et al.*, 2014).

Una de las cuestiones más importantes para el avance en las condiciones de cultivo de embriones *in vitro* en humanos, es que no hay un modelo animal “adecuado” que pueda ser empleado, tal y como se ha descrito. De hecho, la mayoría de estudios se han basado en ensayos en el modelo murino, que pese a ser el modelo animal más empleado en la ciencia, no es el más adecuado para los estudios de embriología y biología reproductiva (Fischer *et al.*, 2012). Existen modelos más similares a la reproducción humana a partir de los cuales poder extrapolar resultados, como es el conejo (Fischer *et al.*, 2012), sin embargo, bajo nuestro conocimiento, no se ha estudiado el cultivo *in vitro* de forma individualizada. El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) es uno de los mamíferos más empleados como animal experimental (2.78%), tan solo por detrás del ratón (59.3%) y la rata (17.7%) en la UE (Fischer *et al.*, 2012). Es empleado para el estudio de una gran variedad de enfermedades humanas, ya sean cardiovasculares, pulmonares,

oftalmológicas, arteriosclerosis, relacionadas con el desarrollo cancerígeno, o bien con desórdenes nerviosos y mentales. (Sparks 2008; Keir y Page, 2008; Peng, 2012; Kamaruzaman *et al.*, 2013; Zernii *et al.*, 2016). Pese a esto, el conejo, surgió como modelo animal debido a que era la especie clásica en la cual estudiar la embriología y la biología reproductiva, lo cual ya se hacía a finales del siglo XIX (Fischer *et al.*, 2012). En 1996 se observó que la distancia filogenética entre conejos y primates era la misma que entre roedores y primates, no obstante, debido a la rápida evolución de los roedores los conejos son más similares genéticamente a los primates, lo cual se aprecia, entre otras cosas, en las primeras etapas de desarrollo embrionario (Graur *et al.*, 1996). Este hecho convierte al conejo en el modelo animal perfecto para estudiar las primeras etapas del desarrollo, ya que los resultados obtenidos son extrapolables a humanos. Además, este modelo presenta otras características biológicas muy ventajosas.

La coneja presenta un ciclo reproductivo corto, cuya gestación tiene una duración de tan solo 31 días, pudiendo darse a partir de los 4-5 meses de edad dependiendo de la raza (Fischer *et al.*, 2012). Además, dispone de dos cuerpos uterinos y cérvix independientes, los cuales evitan la migración de embriones de un útero a otro y permiten la transferencia de dos grupos distintos en la misma coneja (Foote *et al.*, 2000). Por otro lado, es una de las pocas especies donde la ovulación es inducida por el coito, lo que permite definir de forma exacta la edad y etapa de desarrollo de los embriones a la hora de su obtención (Fischer *et al.*, 2012). Otra característica reproductiva de la coneja, imprescindible a la hora de realizar transferencias, es la posibilidad de inducir la pseudogestación mediante tratamiento hormonal, suministrando un análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH, como lo es el acetato de buserelina (Fischer *et al.*, 1986). La fecundación y división celular de los embriones en el modelo conejo han sido estudiadas de forma exhaustiva por Adams (Adams 1960 a; b; 1962; 1982). La ovulación tiene lugar a las 8-10 horas post coito (h.p.c) (Foote *et al.*, 2000). Pasadas dos horas (10-12 h.p.c) tiene lugar la fertilización en el ápula, y a las 14 h.p.c ya se puede apreciar la extrusión del segundo corpúsculo polar (Harper, 1961). El estadio de mórula se alcanza a las 60 h.p.c, a las 68 h.p.c ya se empieza a dar la compactación y a las 72 h.p.c deberíamos poder visualizar embriones en estadio de blastocisto (Fischer *et al.*, 2012). Cabe decir que el desarrollo *in vitro* es más lento que *in vivo*, por ello la visualización del estadio de blastocisto en estas circunstancias se suele realizar a las 72 horas de cultivo *in vitro* (CIV), pasadas 96 horas del coito. La activación del genoma embrionario en el modelo conejo necesita de varios ciclos de división celular, al igual que sucede en humanos, pero contrario a lo que sucede en el modelo ratón, siendo completamente activo a partir del estadio de 8-16 células (Manes, 1973; Telford *et al.*, 1990; Pachego-Trigon *et al.*, 2002). Por lo que respecta a la gastrulación en conejos, se han

identificado 7 etapas, siendo la etapa 0 el estadio de blastocisto sin diferenciación axial aparente en el disco embrionario y, la séptima, aquella en la que se aprecia la aparición de la primera somita (Viebahn *et al.*, 1995). Estas 7 etapas están presentes en todos los mamíferos, incluidos los roedores, donde, sin embargo, el disco embrionario adquiere una forma distinta dificultando la extrapolación de resultados a embriones de otros mamíferos, incluido el humano (Fischer *et al.*, 2012). En cuanto al desarrollo placentario en el modelo conejo, es parecido al observado en humanos y roedores, discoide hemocorial, no obstante, su estructura hemodicorial es más similar a la de humanos (hemomonocorial) que la que presentan los roedores (hemotricorial) (Duval, 1889). Además, al igual que sucede en primates, en el conejo se prioriza el crecimiento placentario en la primera mitad de gestación y el desarrollo fetal en la segunda (McArdle *et al.*, 2009). Por último, los cambios hemodinámicos que tienen lugar durante el embarazo en el modelo conejo son comparables a los observados en humanos, aumentando de igual modo la presión arterial materna conforme avanza la gestación (Fischer *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto del cultivo embrionario *in vitro*, de forma individualizada o en grupo, sobre el desarrollo *in vitro* y sobre la capacidad de implantación y nacimiento empleando el modelo conejo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

En la Figura 2 se describe de forma esquemática el flujo de trabajo que se ha seguido para realizar este estudio. Brevemente, se emplean 10 hembras nulíparas como donantes, que fueron sometidas a un tratamiento de superestimulación ovárica previamente a su inseminación artificial (IA). A las 24 horas post-IA, las hembras donantes fueron eutanasiadas, obteniendo los embriones mediante la perfusión de los oviductos. Una vez recuperados los embriones, estos fueron lavados, catalogados y agrupados. A partir de este momento, los embriones fueron situados en condiciones de cultivo, en grupo (n=10) o de forma individualizada (n=1), y mantenidos durante 72 horas. Transcurrido este periodo se evaluó el desarrollo, y se procedió a la transferencia de aquellos que habían alcanzado el estadio de blastocisto a hembras receptoras. La transferencia oviductal se realizó mediante laparoscopia (técnica mínimamente invasiva). Se transfieren 20 embriones por coneja (10 por cuerno uterino), empleándose 5 conejas por cada grupo experimental. La valoración de la implantación embrionaria se realizó mediante laparoscopia a los 7 días de gestación. Finalmente, el día del parto se determinó el número de animales nacidos.

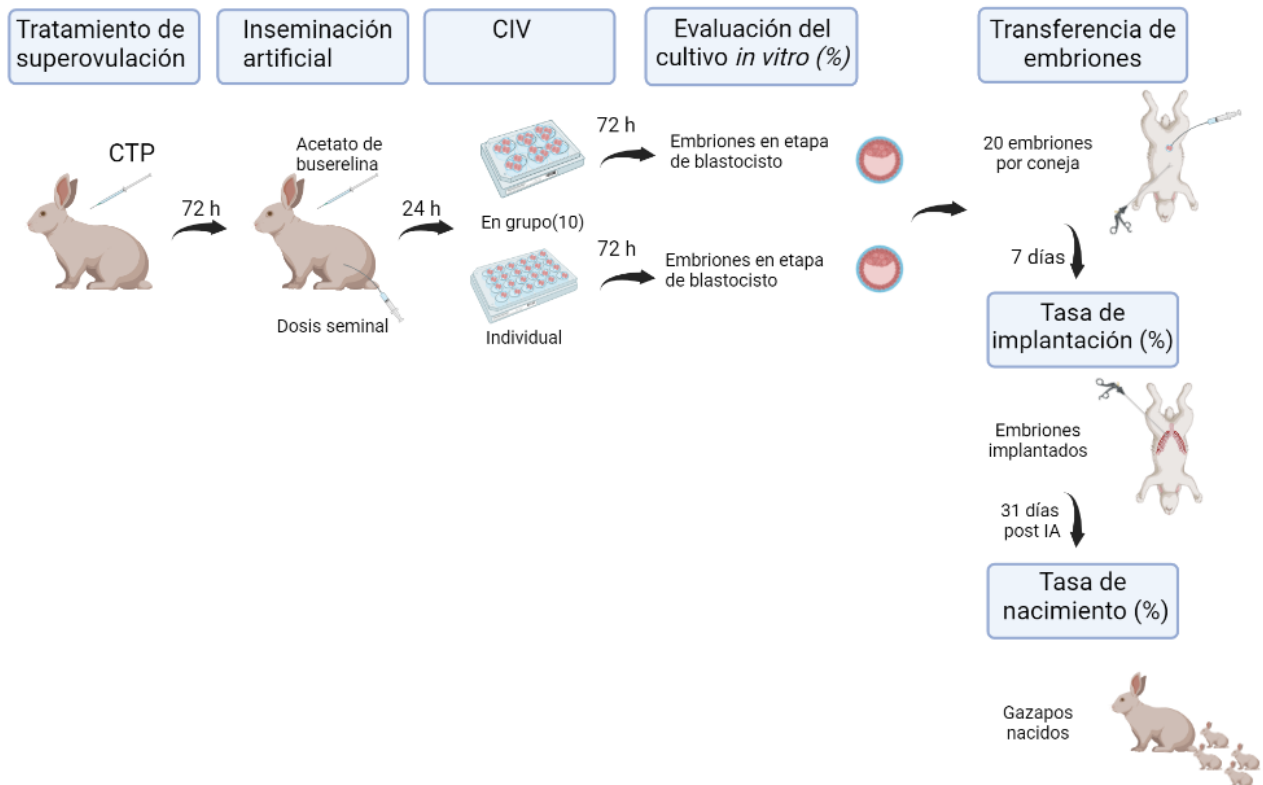


Figura 2. Diseño experimental.

3.2 Animales

La realización de este trabajo fue llevada a cabo en la granja experimental del Grupo de Mejora Genética Animal del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA) de la Universitat Politècnica de València. Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo en este estudio fueron regulados conforme a la Directiva 2010/63/EU EEC para experimentación animal y aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universitat Politècnica de València, España (procedimiento 2021/VSC/PEA/0270). Todos los animales eran de origen Neozelandés Blanco. Se emplearon un total de 20 conejas de 5 meses de edad, 10 como donantes y 10 como receptoras. Todos los animales estaban alojados en box individuales, expuestos a un fotoperiodo alterno de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, libre acceso a pienso comercial y agua.

3.3 Obtención de embriones

Para la obtención de los embriones, se utilizaron 10 hembras sometidas a un tratamiento de superovulación mediante una hormona recombinante FSH de larga duración, Corifolitropina alfa (FSH-CTP, Elonva, 150 g/ml, Merck Sharp & Dohme S.A.; Spain). La hormona se suministró en una sola dosis de 0.75 µg/Kg, vía subcutánea. Pasadas 72 horas tras el suministro de la FSH-CTP, las conejas fueron inseminadas artificialmente, empleando una mezcla heterospermica de machos de probada fertilidad mediante una vagina artificial, siguiendo el procedimiento descrito por Vicente *et al.* (2011). Todos los eyaculados utilizados presentaban un color blanco, una motilidad espermática superior al 70% y un porcentaje de morfología anormal inferior al 25% (Marco-Jiménez *et al.*, 2010). La IA se llevó a cabo con 20-30 millones de espermatozoides por dosis. Coincidiendo con la inseminación, se indujo la ovulación en las conejas mediante la administración intramuscular de 1 µg de acetato de buserelina (análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas, Suprefact; Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, España). A las 24 horas de la IA, las conejas fueron sacrificadas mediante la administración intravenosa de 0.6 g de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Vetoquinol, Madrid, Spain), obteniendo el tracto reproductor que fue llevado al laboratorio para su procesado. Una vez en el laboratorio, se obtuvieron los embriones mediante la perfusión de los oviductos. El medio empleado para ello fue tampón fosfato de Dulbecco (DPBS, Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado con 0.2 % de albúmina de suero bovino (St Louis, MO, USA), 0.133 g/L CaCl₂, 0.100 g/L MgCl₂ y antibióticos (100 UI/mL de penicilina G sódica y 0.01 mg/mL de dihidroestreptomicina; Penivet, Divasa Farmavic, Barcelona,

España), todo ello atemperado previamente a 37°C. El medio se recuperó en una placa tipo Petri (P60) a partir de la cual los embriones fueron recuperados.

3.4 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* se realizó en dos sesiones. Una vez localizados los embriones de la placa Petri, se realizaron varios lavados antes de pasarlos al medio de cultivo. El medio de cultivo empleado en este estudio fue el SAGE 1-Step™ HSA (SAGE 1-STEP, Origio). Como se aprecia en la Figura 3, la mayoría de los embriones se encontraban ya en estadio de dos células, correspondiente al desarrollo embrionario a las 24 horas. El cultivo de embriones *in vitro* en grupo se realizó en grupos de 10 empleando placas de cuatro pocillos de la marca Nunc (Thermo Fisher Scientific), mientras que para el cultivo *in vitro* de embriones en solitario se emplearon placas de 72 pocillos de la marca Nunc (Thermo Fisher Scientific). El cultivo de los embriones en grupo se realizó en un volumen de 100 µL, mientras que los cultivados individualmente se realizó en un volumen de 10 µL. En ambos grupos, el cultivo se realizó bajo aceite mineral Hypure™(Kitazato). El cultivo se llevó a cabo durante 72 horas, en una estufa a 38 °C, y con atmósfera controlada a 5% de CO2 y humedad a saturación.



Figura 3. Embriones de conejo en estadio de cigoto y dos células, obtenidos mediante perfusión de oviducto a las 24 horas de la IA.

3.5 Evaluación del cultivo *in vitro*

A las 72 horas de cultivo (96 horas de desarrollo embrionario preimplantacional), los embriones fueron catalogados bajo un estereoscopio siguiendo los criterios morfológicos que marca la clasificación de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) (Figura 4). Se evaluó el porcentaje de embriones que alcanzaron el desarrollo de blastocisto, sin establecer diferencias entre las etapas de desarrollo de aquellos embriones que no habían llegado a dicha fase.

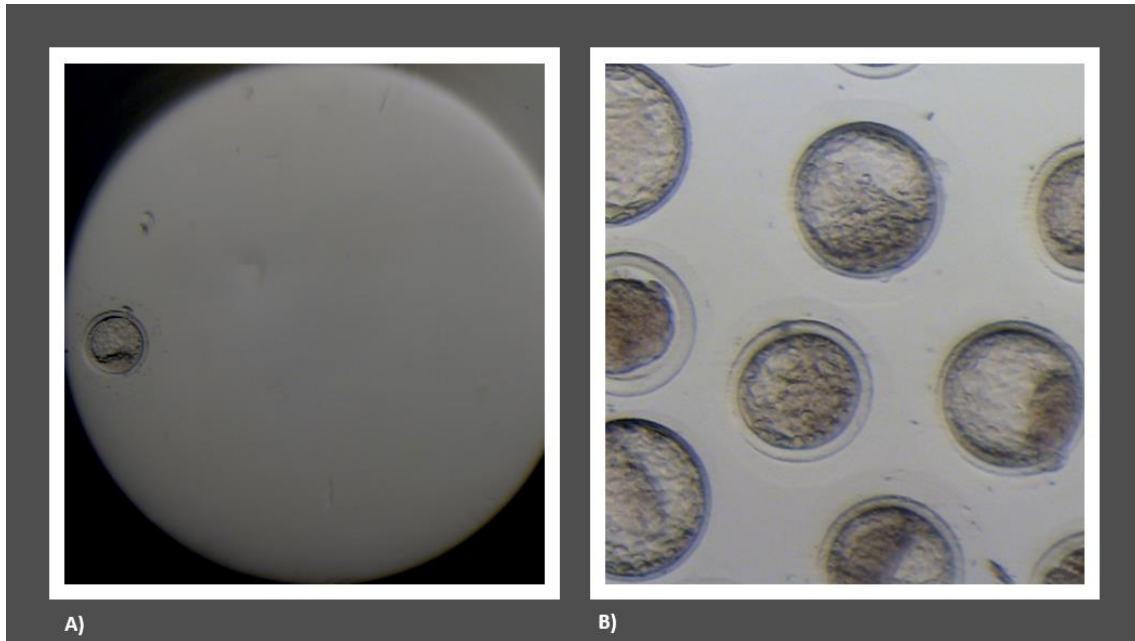


Figura 4. A) Embrión de 72 horas de cultivo *in vitro* cultivado en solitario. B) Embriones de 72 horas de cultivo *in vitro* cultivados en grupo.

3.6 Transferencia de embriones

Se evaluaron un total de 200 embriones (100 por grupo experimental). De forma breve, en primer lugar, se indujo la ovulación en las conejas receptoras (basada en el color y aspecto de la vulva) mediante la administración intramuscular de 1 μg de acetato de busarelina (Hoechst, Marion Roussel, Madrid, España) 72 horas antes de la transferencia. El día de la transferencia, las hembras fueron anestesiadas mediante la inyección intramuscular de 20 mg de xilacina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Germany). Pasados 5 minutos, se administró vía intravenosa 16-20 mg de ketamina hidrocloclórica (Imalgène, Merial SA, Lyon, France). La técnica de transferencia fue realizada siguiendo la técnica descrita por García Domínguez *et al* (2019). A cada coneja se le transfirieron 20 embriones de un único grupo experimental (10 en cada

oviducto). Tras finalizar la transferencia, las conejas fueron tratadas con antibióticos (4mg/Kg de gentamicina cada 24 horas durante tres días, 10% Ganadexil, Invesa, Barcelona, España), analgésicos (0.03 mg/Kg de clorhidrato de buprenorfina cada 12 horas durante 3 días, Buprex, Esteve, Barcelona, España) y antiinflamatorios (0.2 mg/Kg de meloxicam cada 24 horas durante 3 días, Metacam 5 mg/mL, Norvet, Barcelona, España).

3.7 Evaluación de la tasa de implantación y de la tasa de natalidad.

Doce días tras la inducción de la ovulación en las receptoras, se realizó una laparoscopia para determinar la tasa de implantación, siguiendo el procedimiento empleado para la transferencia de los embriones (descritas anteriormente) (Figura 5). La determinación de la tasa de implantación se determinó como el número de embriones implantados respecto al número de embriones transferidos. Tras el parto a los 31 días de gestación, se evaluó la tasa de natalidad como el número de gazapos nacidos respecto de los embriones totales transferidos de cada grupo (Figura 5).



Figura 5. A) Implantación embrionaria. B) Gazapos recién nacidos.

3.8 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante una prueba χ^2 , tanto para evaluar el desarrollo *in vitro* (porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de desarrollo de blastocisto) como el *in vivo* (porcentaje de embriones que implantaron y porcentaje de embriones que generó descendencia) empleando como factor el grupo experimental (cultivo en grupo o individualizado). Todos los análisis estadísticos llevados a cabo en este trabajo se realizaron con el software *IBM SPSS Statistics 28.01.1 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)*. Para todos los análisis se

consideraron como significativos los valores cuyos p-value eran menores de 0,05 (intervalo de confianza del 95%).

4. RESULTADOS

Un total de 409 embriones fueron cultivados *in vitro*, obteniéndose una tasa de blastulación media del 76%, mientras que un total de 200 embriones fueron transferidos a hembras receptoras, obteniéndose una tasa media de implantación del 33.5% y una tasa de nacimiento media del 22.5%.

4.1 Efecto del cultivo embrionario *in vitro* en grupo y en solitario en la tasa de blastulación, implantación y natalidad.

Como se observa en la Tabla 1, el cultivo *in vitro* de embriones de forma individualizada presenta diferencias significativas respecto del cultivo en grupo. En concreto, la tasa de blastulación de los embriones cultivados de forma individualizada fue superior (+12,6%) a la del cultivado en grupo (P= 0,03).

Tabla 1. Efecto del cultivo embrionario *in vitro* en grupo y en solitario en el desarrollo *in vitro* en el modelo conejo.

Desarrollo <i>in vitro</i>		
Grupo	Embriones cultivados	Tasa de blastulación (%)
Cultivo individual	200	82.5 ^a
Cultivo en grupo	209	69.9 ^b

^{a,b} Valores de la misma columna con diferente superíndice son estadísticamente significativos (P< 0.05).

En cuanto al desarrollo *in vivo*, no se aprecian diferencias significativas (P= 0,881) ni en la tasa de implantación ni en la tasa de nacimiento de ambos grupos experimentales (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del cultivo embrionario *in vitro* en grupo y en solitario en el desarrollo *in vivo* en el modelo conejo.

Desarrollo <i>in vivo</i>			
Grupo	Embriones transferidos	Tasa de implantación (%)	Tasa de nacimiento (%)
Cultivo individual	100	33.0	20.0
Cultivo en grupo	100	34.0	25.0

5. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran una tasa de desarrollo *in vitro* media del 76%, siendo algo superior la obtenida en el grupo individual (82,5% vs 69,9%, para individual y en grupo, respectivamente). Valores que se encuentran dentro de lo descrito en la bibliografía. En concreto, los estudios realizados en conejo hasta la fecha muestran una tasa de desarrollo de embriones preimplantacionales cultivados *in vitro* desde cigoto hasta blastocisto que oscila entre el 58 y el 92%, siendo la tasa más frecuente del entorno del 75% (Carney y Foote, 1990:1991; Jin *et al.*, 2000; Escribá *et al.*, 2001; Sultana *et al.*, 2009). En cuanto al desarrollo *in vivo*, nuestros resultados muestran una tasa de nacimiento media del 22.5%, siendo similar entre ambos grupos (20% vs 25%, para individual y en grupo, respectivamente). Resultados que se encuentran dentro de los resultados descritos en trabajos previos, oscilando entre el 12 y el 34% (Carney y Foote, 1991 y Escribá *et al.*, 2001). En nuestro estudio, además, se observa que no hay diferencias en términos de implantación (33% vs 34%, para individual y en grupo, respectivamente), siendo las pérdidas fetales (embriones implantados respecto a los nacidos) similares en ambos grupos (39% vs 26%, para individual y en grupo, respectivamente). Estos resultados en global demostrarían la posibilidad de emplear el cultivo individualizado como modelo de aplicación para el desarrollo de técnicas en embriología humana.

Los estudios realizados hasta la fecha indican que tanto en humanos, como en los modelos animales murino y bovino, el cultivo grupal produce embriones de mejor calidad y una mayor tasa de blastulación que el cultivo de forma individual (Dai *et al.*, 2012; Wydooghe *et al.*, 2014; Lehner *et al.*, 2017), resultados contrarios a los observados en este estudio, donde incluso se ha observado una mejora del desarrollo *in vitro* en el cultivo individualizado, si bien, estas diferencias no son relevantes en términos de calidad embrionaria basados en la implantación y en el número de individuos nacidos. No obstante, una de las explicaciones de este hecho podría ser la liberación de factores apoptóticos de aquellos embriones cultivados en grupo que quedan bloqueados en su desarrollo, pero que permanecen en el cultivo durante todo el periodo. Así, en bovino, se determinó que eliminar aquellos embriones apoptóticos del cultivo *in vitro* en grupo no presentaba mejoras en el desarrollo de los embriones vecinos restantes (Wydooghe *et al.* 2014). Otra de las razones que pueden haber mejorado el desarrollo de los embriones cultivados de forma individual es el reducido volumen de medio de cultivo empleado, 10 μ L, aunque en proporción, aquellos cultivados en grupo también poseían el mismo volumen. El reducido volumen empleado puede haber favorecido la concentración de los factores autocrinos liberados por el embrión, simulando la concentración que encontraríamos en el cultivo en grupo. En cuanto a los embriones obtenidos en etapa de blastocisto mediante el cultivo en solitario,

cabe decir que tras evaluar la tasa de implantación y la tasa de natalidad (Tabla 2), no se aprecia que la calidad de estos sea inferior a la de aquellos obtenidos mediante el cultivo en grupo. Destacar que, que nosotros sepamos, no hay en la bibliografía ningún trabajo que compare el cultivo individual y en grupo en embriones de conejo, lo que hace más difícil la discusión de nuestros resultados. Hasta la fecha, es el modelo murino el más empleado en los estudios de reproducción humana (Fischer *et al.*, 2012), a pesar de que este modelo ha demostrado verse afectado cuando el cultivo se realiza de forma individualizada (Dai *et al.*, 2012). Es por ello que, en base a nuestros resultados, proponemos el modelo conejo como más idóneo para llevar a cabo estudios *in vitro* en la reproducción humana.

6. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que, el modelo conejo es ideal para llevar a cabo estudios en los que se requiera el desarrollo de embriones tempranos *in vitro* individualizados, dado que estos no presentan ninguna diferencia de desarrollo ni *in vitro* ni *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS CE., 1960a. Embryonic mortality induced experimentally in the rabbit. *Nature*, 188:332-333.

ADAMS CE., 1960b. Prenatal mortality in the rabbit "*Oryctolagus cuniculus*". *Journal of Reproduction and Fertility*, 1: 36-44.

ADAMS CE., 1962. Studies on prenatal mortality in the rabbit, "*Oryctolagus cuniculus*": the effect of transferring varying numbers of eggs. *Journal of Endocrinology*, 24: 471-490.

ADAMS CE., 1982. Egg transfer in the rabbit. In *Mammalian Egg Transfer*, 29-48. Boca Ratón, FL: CRC Press.

ADAMSON, G.D., DE MOUZON, J., CHAMBERS, G.M., ZEGERS-HOCHSCHILD, F., MANSOUR, R., ISHIHARA, O., BANKER, M. and DYER, S., 2018. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011. *Fertil Steril*, 110: 1067-1080

BASILE, N., MORBECK, D., GARCÍA-VELASCO, J., BRONET, F. and MESEGUER, M., 2013. Type of culture mediadoes not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod*, 28: 634-641.

CARNEY, E.W. and FOOTE, R.H., 1990. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil*, 2:51-543.

CARNEY, E.W. and FOOTE, R.H., 1991. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *J Reprod Fertil*, 1:23-113.

CHANG, M.C., 1947. Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. *Nature*, 159: 602–602.

CHATOT, C.L., ZIOMEK, C.A., BAVISTER, B.D., LEWIS, J.L. and TORRES, I., 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 86: 679–688.

CHRONOPOLOU, E. and HARPER, J.C., 2015. IVF culture media: past, present and future. *Hum Reprod*, (Update)1: 39-55.

DAI, S.J., XU, C.L., WANG, J., SUN, Y.P. and CHIAN R.C., 2012. Effect of culture medium volume and embryo density on early mouse embryonic development: tracking the development of the individual embryo. *J Assist Reprod Genet*, 7: 23-617.

DAL BOSCO, A., REBOLLAR, P.G., BOITI, C., ZERANI, M. and CASTELLINI, C., 2011. Ovulation induction in rabbit does: current knowledge and perspectives. *Anim Reprod Sci*, 3-4: 106-17.

DUVAL, M., 1889. Le placenta des rongeurs: Le placenta du lapin. *Journal de L'Anatomie et de la Physiologie Normales et Pathologiques de L'Homme et des Animaux*, 25: 573–627.

EDWARDS, R.G., STEPTOE, P.C., 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 312: 366.

EDWARDS, R.G., STEPTOE P.C. and PURDY, J.M., 1970. Fertilization and cleavage *in vitro* of preovulatory human oocytes. *Nature* 227: 1307-1309.

EMBRYOSCOPE PLUS. (s/f). Ivfmiraclebaby.com. Recuperado el 11 de junio de 2022, de <https://www.ivfmiraclebaby.com/embryoscope-plus/>

ESCRIBÁ, M.J., SILVESTRE, M.A., SAEED, A.M. and GARCÍA-XIMÉNEZ, F., 2001. Comparison of the effect of two different handling media on rabbit zygote developmental ability. *Reprod Nutr Dev*, 2:6-181.

FISCHER, B., CHAVATTE-PALMER, P., VIEBAHN, C., NAVARRETE SANTOS, A. and DURANTHON, V., 2012. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reprod Camb Engl*, 144: 1–10.

FISCHER, B., WINTERHAGER, E. and BUSCH, L.C., 1986. Transformation of endometrium and fertility in late stages of pseudopregnancy in the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78: 529–540.

FOOTE, R.H. and CARNEY, E.W., 2000. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. *Reprod Toxicol*, 6: 93-477.

GARCÍA-DOMÍNGUEZ, X., MARCO-JIMÉNEZ, F., VIUDES-DE-CASTRO, M.P. and VICENTE, J.S., 2019. Minimally Invasive Embryo Transfer and Embryo Vitrification at the Optimal Embryo Stage in Rabbit Model. *J Vis Exp*, 147.

GARDNER, D.K., 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int*, 18: 1163–1179.

GARDNER, D. and LANE M., 1997. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod*, (Update) 3: 367–382.

GRAUR, D., DURET, L. and GOUY, M., 1996. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*, 6563 :5-333.

GRECO, E., LITWICKA, K., MINASI, M.G., CURSIO, E., GRECO, P.F. and BARILLARI, P., 2020. Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. *Int J Mol Sci*, 12: 4381.

HARPER, M.J., 1961. The time of ovulation in the rabbit following the injection of luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology*, 22: 147–152.

HENTEMANN, M. and BERTHEUSSEN, K., 2009. New media for culture to blastocyst. *Fertil Steril*, 91:878–883.

JIN, D.I., KIM, D.K., IM, K.S. and CHOI, W.S., 2000. Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown in vitro from single-cell zygotes. *Theriogenology*, 7:16-1109.

JOHNSON, M.H., 2019. A short history of in vitro fertilization (IVF). *Int J Dev Biol*, 3-4-5: 83-92.

KAMARUZAMAN, N.A., KARDIA, E., KAMALDIN, N., LATAHIR, A.Z. and YAHAYA, B.H., 2013. The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy. *Biomed Res Int*, 691830.

KEIR, S. and PAGE, C., 2008. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. *Pulm Pharmacol Ther*, 5: 30-721.

KELLEY, R.L. and GARDNER, D.K., 2019. Individual culture and atmospheric oxygen during culture affect mouse preimplantation embryo metabolism and post-implantation development. *Reprod Biomed Online*, 1: 3-18.

KELLEY, R.L. and GARDNER, D.K., 2017. In vitro culture of individual mouse preimplantation embryos: the role of embryo density, microwells, oxygen, timing and conditioned media. *Reprod Biomed Online*, 5: 441-454.

LEHNER, A., KASZAS, Z., MURBER, A., RIGO, J. Jr., URBANCSEK, J. and FANCSOVITS, P., 2017. Embryo density may affect embryo quality during in vitro culture in a microwell group culture dish. *Arch Gynecol Obstet*, 2: 345-353.

LEWIS, W.H. and GREGORY P.W., 1929. Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science*, 69:226–229.

LUNDIN, K. and PARK, H., 2020. Time-lapse technology for embryo culture and selection. *Ups J Med Sci*, 2: 77-84.

MANES, C., 1973. The participation of embryonic genome during early cleavage in the rabbit. *Developmental Biology*, 32: 453–459.

MARCO-JIMÉNEZ, F., VICENTE, J.S., LAVARA, R., BALASCH, S. and VIUDES-DE-CASTRO, M.P., 2010. Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Reprod Domest Anim*, 5: 23-118.

McARDLE, A.M., DENTON, K.M., MADUWEGEDEA, D., MORITZ, K., FLOWER, R.L. and ROBERTS, C.T., 2009. Ontogeny of placental structural development and expression of the renin-angiotensin system and 11b-HSD2 genes in the rabbit. *Placenta*, 30: 590–598.

MESEGUER, M., HERRERO, J., TEJERA, A., HILLIGSOE, K.M., RAMSING, N.B. and REMOHI, J., 2011. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*, 26: 71-2658.

MESEGUER, M., RUBIO, I., CRUZ, M., BASILE, N., MARCOS, J. and REQUENA A., 2012. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril*, 98: 1481–1489.

NIEDERBERGER, C., PELLICER, A., COHEN, J., GARDNER, D.K., PALERMO, G.D., O'NEILL, C.L., CHOW, S., ROSENWAKS, Z., COBO, A., SWAIN, J.E., SCHOOLCRAFT, W.B., FRYDMAN, R., BISHOP, L.A., AHARON, D., GORDON, C., NEW, E., DECHERNEY, A., TAN, S.L., PAULSON, R.J., GOLDFARB, J.M., BRANSNSTROM, M., DONNEZ, J., SILBER, S., DOLMANS, M.M., SIMPSON, J.L., HANDYSIDE, A.H., Munne, S., EGUIZABAL, C., MONTSERRAT, N., IZPISUA BELMONTE, J.C., TROUNSON, A., SIMON, C., TULAND, T., GIUDICE, L.C., NORMAN, R.J., HSUEH, A.J., SUN, Y., LAUFFER, N., KOCHMAN, R., ELDAR-GEVA, T., LUNENFELD, B., EZCURRA, D., D'HOOGHE, T., FAUSER, B., TARÑATZIS, B.C., MELDRUM, D.R., CASPER, R.F., FATEMI, H.M., DEVROEY, P., GALLIANO, D., WIKLAND, M., SIGMAN, M., SCHOOR, R.A., GOLDSTEIN, M., LIPSHULTZ, L.I., SCHLEGEL, P.N., HUSSEIN, A., OATES, R.D., BRANNIGAN, R.E., ROSSO, H.E., PENNING, G., KLOCK, S.C., BROWN, S., VAN STEIRTEGHEM, A., REBAR, R.W. and LABARBERA, A.R., 2018. Forty years of IVF. *Fertil Steril*, 110: 185-324.

PACHECO-TRIGON, S., HENNEQUET-ANTIER, C., OUDIN, J.F., PIUMI, F., RENARD, J.P. and DURANTHON, V., 2002. Molecular characterization of genomic activities at the onset of zygotic transcription in mammals. *Biology of Reproduction*, 67: 1907–1918.

PENG, X., 2012. Transgenic rabbit models for studying human cardiovascular diseases. *Comp Med*, 6: 9-472.

SPARKS, D.L., 2008. The early and ongoing experience with the cholesterol-fed rabbit as a model of Alzheimer's disease: the old, the new and the pilot. *J Alzheimers Dis*, 4: 56-641.

STEPTOE, P.C., EDWARDS, R.G. and PURDY, J.M., 1971. Human blastocysts grown in culture. *Nature*, 229: 132-133.

SULTANA, F., HATORI, M., SHIMOZAWA, N., EBISAWA, T. and SANKAI, T., 2009. Continuous observation of rabbit preimplantation embryos in vitro by using a culture device connected to a microscope. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 1:6-52.

SUMMERS, M., BIRD, S., MIRZAI, F., THORNHILL, A. and BIGGERS, J., 2013. Human preimplantation embryo development in vitro: a morphological assessment of sibling zygotes cultured in a single medium or in sequential media. *Hum Fertil*, 16: 278–285.

TELFORD, N.A., WATSON, A.J. and SCHULTZ, G.A., 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development*, 26: 90–100.

VICENTE, J.S., LAVARA, R., MARCO-JIMÉNEZ, F. and VIUDES-DE-CASTRO, M.P., 2011. Detrimental effect on availability of busserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*. 6: 5-1120.

VIEBAHN, C., MAYER, B. and & HRABE DE ANGELIS, M., 1995. Signs of the principle body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anatomica Embryologica*, 192: 159–169.

WYDOOGHE, E., VANDAELE, L., PIEPERS, S., DEWULF, J., VAN DEN ABBEEL, E., DE SUTTER, P. and VAN SOOM, A., 2014. Individual commitment to a group effect: strengths and weaknesses of bovine embryo group culture. *Reproduction*, 5: 29-519.

ZERNII, E.Y., BAKSHEEVA, V.E., LOMDINA, E.N., AVERINA, O.A., PERMYAKOV, S.E., PHILIPPOV, P.P., ZAMYATNIN, A.A. and SENIN I.I., 2016. Rabbit Models of Ocular Diseases: New Relevance for Classical Approaches. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 3: 91-267.