

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES DE CONEJO DE 8-16 CÉLULAS EN MEDIOS CON ETILENGLICOL Y DEXTRANO***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: ALBA MARTÍ ALEMANY

TUTOR: JOSÉ SALVADOR VICENTE ANTÓN

*Curso Académico: 13/14*

VALENCIA, JUNIO de 2014



**Título TFG:** Vitricación de embriones de conejo de 8-16 células en medios con etilenglicol y dextrano

**Alumna:** Dña. Alba Martí Alemany

**Tutor Académico:** Prof. D. José Salvador Vicente Antón

Valencia, junio de 2014

## RESUMEN

La vitricación de estadios de desarrollo embrionario temprano (de pronúcleos a 16 células) es todavía un reto, ya que dichos estadios presentan mayor sensibilidad a la velocidad de descenso de la temperatura, al estrés osmótico y a las elevadas concentraciones de crioprotectores empleadas en las soluciones de vitricación.

Este estudio pretende definir tanto un medio de vitricación de baja toxicidad con etilenglicol, dextrano y sacarosa como el soporte para la crioconservación de embriones de conejo de 8-16 células, evaluando la viabilidad *in vitro* de los embriones post-vitricación tras 72 horas de cultivo y estudiando los niveles de expresión de los genes marcadores de pluripotencia *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* de los blastocistos obtenidos del cultivo.

Los embriones de conejo de 8-16 células se obtuvieron a partir de hembras sometidas a un tratamiento de superovulación con FSH, administrado en 5 dosis cada 12 horas. A continuación, 12 horas después de la última dosis, las hembras fueron inseminadas y 38-40 horas más tarde se procedió a la recuperación de los embriones mediante la perfusión de los oviductos. El proceso de vitricación se realizó empleando tres medios con un 40% de etilenglicol (v/v) y diferentes contenidos de dextrano y sacarosa y, dos soportes distintos (*straw* y *CryoTop*). Después de la desvitricación, los embriones fueron cultivados *in vitro* durante 72 horas para su valoración, observando si alcanzaban los estadios de mórula y blastocisto. Por último, en los grupos control y de vitricación con mejores ratios de desarrollo a blastocisto, se evaluó la viabilidad inmediata post-vitricación mediante tinción vital fluorescente y se realizó un estudio de la expresión relativa de los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* sobre los blastocisto obtenidos del cultivo.

El medio de vitricación con un 18% (p/v) de dextrano y 0'3M de sacarosa, proporcionó las mejores tasas de desarrollo embrionario *in vitro*. Por último, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* entre los blastocistos control y los vitricados.

## PALABRAS CLAVE

Vitricación, embriones tempranos, expresión génica, etilenglicol, dextrano, conejo.

## ABSTRACT

Vitrification of early stage embryos (from pronucleus to 16-cell embryos) is still a challenge. These embryonic development stages show a high sensibility to rapid cooling rates, osmotic stress and the high concentrations of cryoprotectants required for the vitrification process.

The aim of this work was to define a low toxicity vitrification solution containing ethylene glycol, dextran and sucrose as well as the carrier system for the cryoconservation of 8-16-cell rabbit embryos. In addition to evaluating the postvitrification survival of embryos cultured *in vitro* for 72 hours and studying the expression level of *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* pluripotency gene markers in the blastocysts obtained by culture.

The 8-16-cell rabbit embryos were obtained from superovulated females treated intramuscularly with FSH, provided in 5 doses every 12 hours. Artificial insemination was performed 12 hours after the last injection. Between thirty-eight and forty hours after insemination, embryos were recovered by flushing the oviducts.

Vitrification was carried out using three solutions containing 40% (v/v) ethylene glycol supplemented with different concentrations of dextran and sucrose, employing straws or CryoTops as the carrier system. After warming procedure, embryos were cultured *in vitro* for 72 hours up to the morulae or blastocyst stage. Embryo viability was assessed immediately after warming, in control group and vitrification groups which showed the highest rates of development to blastocyst stage using fluorescent vital staining. Relative expression of *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* genes was studied in blastocysts obtained by culture in these groups.

Vitrification media supplemented with 18% (w/v) dextran and 0.3M sucrose gave the better rate of embryonic development *in vitro*. No significant differences were observed in expression levels of *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* genes between control and vitrified blastocysts.

## KEY WORDS

Vitrification, early stage embryos, gene expression, ethylene glycol, dextran, rabbit.

## RESUM

La vitrificació d'estadis de desenvolupament embrionari primerenc (de pronuclis a 16 cèl·lules) és encara un repte, ja que aquests estadis presenten major sensibilitat a la velocitat de descens de la temperatura, a l'estrès osmòtic i a les elevades concentracions de crioprotectors empleades en les solucions de vitrificació.

Aquest estudi pretén definir tant un medi de vitrificació de baixa toxicitat amb etilenglicol, dextrà i sacarosa com l'envàs per a la crioconservació d'embrions de conill de 8-16 cèl·lules, avaluant la viabilitat *in vitro* dels embrions post-vitrificació després de 72 hores de cultiu i estudiant els nivells d'expressió dels gens marcadors de pluripotència *OCT4*, *SOX2* i *NANOG* dels blastocists obtinguts del cultiu.

Els embrions de conill de 8-16 cèl·lules es van obtenir a partir de femelles sotmeses a un tractament de superovulació amb FSH, administrat en 5 dosi cada 12 hores. A continuació, 12 hores després de l'última dosi, les femelles van ser inseminades i 38-40 hores més tard es va procedir a la recuperació dels embrions mitjançant la perfusió dels oviductes. El procés de vitrificació es va realitzar utilitzant tres medis amb un 40% d'etilenglicol (v/v) i diferents continguts de dextrà i sacarosa, i dos envasos diferents (*straw* i *CryoTop*). Després de la desvitrificació, els embrions van ser cultivats *in vitro* durant 72 hores per a la seua valoració, observant si s'aconseguien els estadis de mòrula i blastocist. Finalment, en els grups control i de vitrificació amb millors ràtios de desenvolupament a blastocist, es va avaluar la viabilitat immediata post-vitrificació mitjançant la tinció vital fluorescent i es va realitzar un estudi de l'expressió relativa dels gens *OCT4*, *SOX2* i *NANOG* sobre els blastocists obtinguts del cultiu.

El medi de vitrificació amb un 18% (p/v) de dextrà i 0'3M de sacarosa, va proporcionar les millors taxes de desenvolupament embrionari *in vitro*. Finalment, no es van observar diferències significatives en els nivells d'expressió dels gens *OCT4*, *NANOG* i *SOX2* entre els blastocists control i els vitrificats.

## PARAULES CLAU

Vitrificació, embrions primerencs, expressió gènica, etilenglicol, dextrà, conill.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a este proyecto he aprendido la dedicación y esfuerzo que requiere el campo la investigación y la satisfacción que proporciona el alcanzar determinados resultados aunque por el camino te encuentres con ciertos obstáculos que superar.

En primer lugar, quiero darle las gracias a mi tutor José por darme la oportunidad de realizar este trabajo, además de todo su tiempo y empeño puesto en él. También, quiero agradecerle su ayuda, paciencia y todo lo que me ha enseñado en cuanto al trabajo de laboratorio y el mundo de la reproducción animal.

Además, quiero agradecerles a Paco, Carmen, Amparo y Luis, el haberme ayudado en todo momento, y en especial a Estrella por echarme un mano en mi proyecto junto con Mara, a la que también quiero agradecer sus consejos y su paciencia conmigo.

A continuación, quiero agradecer a mis compañeros de clase, de TFG, y también amigos, Cristina y Alejandro toda la ayuda, apoyo y consejos que me han dado durante estos cuatro años de carrera. Me alegro mucho de haberos conocido y espero que aunque nuestros caminos se separen nuestra amistad siga durante muchos muchos años. También quiero darles las gracias a mis también compañeras de clase y amigas Isa, Ainhoa, Sandra y Raquel por todos los buenos momentos vividos durante estos cuatro años dentro y fuera de clase. No podía olvidarme de Miguel, gracias por todos los momentos graciosos que nos has aportado, sin ti todos los trabajos durante estos años hubieran sido mucho más aburridos.

También quiero agradecer a mis amigos de siempre: Andrea, Eliseo, Irene, Alex, David y María, el apoyo que me han dado y los momentos de desconexión que he podido pasar a su lado. Gracias por todas las fiestas, cumpleaños, comidas, cenas, viajes y sobretodo “aventuras” que hemos vivido. Gracias chicos por todos estos años juntos que espero que aunque algunos de vosotros vayáis a estar lejos una temporada, no perdamos el contacto y sean muchos más los años juntos que nos queden por delante.

No podía olvidarme de la amiga de mi madre y también mi amiga, M<sup>a</sup> José a la que agradezco todo lo que se preocupa por mi y también a Cari por ser como mi segunda madre.

Por último, quiero darles las gracias a mi padre Enrique y a mi madre Concha por haberme ayudado y apoyado siempre e intentar contribuir en todo lo posible. Gracias papás por quererme, por vuestra paciencia infinita conmigo, por aguantarme y estar ahí siempre que lo he necesitado, sin vosotros nunca podría haber llegado hasta aquí. También quiero agradecer al que siempre será “el meu germanet” Jose todos los buenos momentos vivido juntos y el entendernos solo como los hermanos pueden hacerlo.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. FUNDAMENTOS DE CRIOBIOLOGÍA .....	1
1.1.1. CONGELACIÓN .....	2
1.1.2. VITRIFICACIÓN .....	4
1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS SOLUCIONES DE VITRIFICACIÓN .....	5
1.3. LIMITACIONES Y RETOS DE LA CRIOCONSERVACIÓN EMBRIONARIA .....	7
1.3.1. ESTADIOS DE DESARROLLO TEMPRANO .....	7
1.3.2. EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO .....	8
1.3.3. AVANCES EN EL PROCESO DE VITRIFICACIÓN .....	9
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	12
3.2. ANIMALES .....	13
3.3. RECUPERACIÓN DE EMBRIONES .....	13
3.3.1. TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN .....	13
3.3.2. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL .....	14
3.3.3. OBTENCIÓN Y CATALOGACIÓN DE LOS EMBRIONES .....	14
3.4. SOLUCIÓN Y PROCEDIMIENTO DE VITRIFICACIÓN .....	15
3.5. DESVITRIFICACIÓN Y CULTIVO DE EMBRIONES .....	15
3.6. VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD EMBRIONARIA .....	16
3.7. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	16
3.7.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN MENSAJERO .....	17
3.7.2. OBTENCIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO .....	18
3.7.3. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD Y LA EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN .....	18
3.7.4. CUANTIFICACIÓN RELATIVA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL .....	20
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
4.1. DESARROLLO <i>IN VITRO</i> DE LOS EMBRIONES VITRIFICADOS CON LOS DIFERENTES MEDIOS Y SOPORTES .....	22
4.2. VIABILIDAD DE LOS EMBRIONES AL PROCESO DE VITRIFICACIÓN .....	25

4.3. EFECTO DE LA VITRIFICACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	27
4.3.1. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE AMPLIFICACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR .....	27
4.3.2. VALORACIÓN DE LA EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR .....	29
4.3.3. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE EMBRIONES VITRIFICADOS CON DIFERENTES MEDIOS Y SOPORTES.....	31
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>33</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Acontecimientos físicos que ocurren en las células durante la congelación (Mazur,1984).
- Figura 2. Programa de congelación caracterizado por 3 fases de disminución de la temperatura y la formación inducida de hielo.
- Figura 3. Proceso de congelación y vitrificación, antes del enfriamiento durante y una vez en nitrógeno líquido. Los hexágonos simbolizan la formación de cristales de hielo (Adaptada de Fahy y Rall, 2007).
- Figura 4. Embrión humano en estadio de 8 células, en una solución con un 10% de etilenglicol (EG), y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO). Debido a la sustitución del agua intracelular por la mezcla EG/DMSO, tiene lugar una contracción volumétrica de cada una de las 8 blastómeras (Liebermann *et al.*, 2003).
- Figura 5. Soportes superficiales empleados en la vitrificación: (1) rejillas EM, (2) tamaño mínimo de gota, (3) *CryoTop*, (4) *Cryoloop*, (5) *Hemi-straw* (Adaptada de Saragusty y Arav, 2011).
- Figura 6. Soportes tubulares más utilizados para la vitrificación: (1) pajuelas de plástico, pajuelas estiradas abiertas (OPS), pajuelas estiradas abiertas superfinas (SOPS) y *flexipet-denuding pipette*, (2) *CryoTip*, (3) dispositivo de vitrificación de alta seguridad. (Adaptada de Saragusty y Arav, 2011).
- Figura 7. Esquema de los experimentos llevados a cabo.
- Figura 8. Embriones de conejo de 8-16 células, todos muestran simetría y homogeneidad celular.
- Figura 9. Soportes empleados en el proceso de vitrificación: (A) *CryoTop*, (B) *straw*.
- Figura 10. Pasos a seguir para realizar la extracción de ARNm con el método de extracción Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit.
- Figura 11. Mórulas de conejo a las 72h de cultivo *in vitro*. Imagen tomada con un microscopio óptico.
- Figura 12. Blastocisto de conejo a las 72h de cultivo *in vitro*. Imagen tomada con un microscopio óptico.
- Figura 13. Embriones de conejo de 8-16 células pertenecientes al grupo control. Todas sus blastómeras se han teñido solamente con SYBR14 lo que prueba su viabilidad. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia.
- Figura 14. Embriones de conejo de 8-16 células pertenecientes al grupo control. Cada una de sus blastómeras emite fluorescencia verde debido a la tinción con SYBR14. La ausencia de fluorescencia de color rojo demuestra la viabilidad celular. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia.
- Figura 15. Embrión de conejo de 8-16 células vitrificado con *straw*, parcialmente dañado, ya que 3 de sus blastómeras se han teñido con IP. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia con el filtro que solamente permite ver la fluorescencia de color rojo.

Figura 16. Embriones de conejo de 8-16 células vitrificados con *straw*, todas sus blastómeras se han teñido solamente con SYBR14, demostrando así la viabilidad de las mismas. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia.

Figura 17. Embriones de conejo de 8-16 células, vitrificados con *CryoTop*, se observan 5 embriones dañados, ya que los núcleos de sus blastómeras han sido teñidos con IP. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia solamente con el filtro para observar la tinción roja.

Figura 18. Embriones de conejo de 8-16 células, vitrificados con *CryoTop*, se observan 5 embriones dañados y uno parcialmente dañado durante el proceso de vitrificación. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia con los filtros para observar ambas tinciones.

Figura 19. Viabilidad obtenida para los distintos grupos analizados: control, vitrificados con *straw* y vitrificados con *CryoTop*.

Figura 20. Gel de agarosa al 2% con los productos de la amplificación de los *primers* utilizados para los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*.

Figura 21. Curva de disociación del producto amplificado con los *primers* de *NANOG* tras la PCR a tiempo real. Se encuentra representada la temperatura de disociación ( $T_m$ ) frente a la derivada de la fluorescencia. Se observa que solamente se ha producido la amplificación de un único fragmento.

Figura 22. Rectas de eficiencia para los diferentes genes: *H2AFZ*, *GAPDH*, *NANOG*, *OCT4* y *SOX2*.

Figura 23. Niveles de expresión génica diferencial de los genes *NANOG*, *OCT4* y *SOX2* en embriones vitrificados con un medio 18% dextrano y sacarosa con los soportes de *straw* y *CryoTop*, y un medio 10% dextrano y sacarosa con *CryoTop*.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Programa de tiempos y temperaturas proporcionado por el fabricante para llevar a cabo la retrotranscripción.

Tabla 2. Características de los *primers* utilizados.

Tabla 3. Reactivos con las cantidades correspondientes utilizados para la PCR común.

Tabla 4. Protocolo de tiempos y temperaturas empleadas en la PCR.

Tabla 5. Programa de tiempos y temperaturas utilizado en la qPCR.

Tabla 6. Embriones en desarrollo obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de embriones vitrificados en diferentes condiciones.

Tabla 7. Blastocistos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de embriones vitrificados en diferentes condiciones.

Tabla 8. Eficiencias obtenidas para la reacción de PCR de cada uno de los genes.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la cuantificación relativa de la expresión génica.

# 1

## Introducción

---

1. Fundamentos de criobiología
2. Características físico-químicas de las soluciones de vitrificación
3. Limitaciones y retos de la crioconservación embrionaria

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1. Fundamentos de criobiología

La criobiología es la parte de la biología que tiene como objetivo conservar a largo plazo, quizá indefinidamente, células, tejidos y/o organismos mediante el descenso de la temperatura, de modo que el proceso sea reversible.

La consecuencia de un descenso a temperaturas supracero (0-5°C) es una reducción de la actividad metabólica, aproximándose el comportamiento termodinámico de la célula al de un sistema cerrado en el que solamente tienen lugar intercambios de energía con el medio. De este modo, sólo se consigue un ligero incremento del periodo eficaz de conservación, en el caso de un grupo celular como son los embriones, es posible mantenerlos durante 7 días. Si la temperatura continúa descendiendo hasta que el intercambio de energía entre la célula y el medio sean mínimos, el estado sólido se impone y el sistema se aproxima al equilibrio termodinámico, en esta situación la energía disponible es insuficiente para alcanzar la energía de activación de cualquier reacción metabólica. Es posible aproximarse a este equilibrio a temperaturas inferiores a -130°C. Por debajo de esta temperatura el agua de las células está en forma vítrea o cristalizada y tan sólo el efecto de la radiación de fondo sobre el ADN podría provocar la pérdida gradual de viabilidad. (Renard, 1985; Mazur, 2010)

El resultado que se alcance en el proceso de crioconservación dependerá de los acontecimientos que ocurran en las células de manera individual. El conocimiento de las causas de la muerte celular, especialmente durante el proceso de enfriamiento y el hallazgo de métodos capaces de prevenir estas causas, han permitido el almacenaje a largo plazo de células y tejidos vivos.

Los principales acontecimientos físicos que acaecen en las células durante la congelación aparecen descritos esquemáticamente en la Figura 1. Cuando la temperatura se encuentra por debajo de los -5°C, las células y el medio ubicado a su alrededor, no se congelan ya que tiene lugar un superenfriamiento y un descenso del punto de congelación debido a la presencia de crioprotectores. Entre los -5°C y los -15°C, se forma hielo en el medio exterior y se incrementa la concentración de solutos en el agua no congelada, lo que resulta en un incremento de la presión osmótica que favorece el flujo de agua desde la célula, su deshidratación y la reducción del punto de congelación del citoplasma. Si el enfriamiento es lento, la salida del agua será lo suficientemente rápida para alcanzar una concentración intracelular de solutos que permita poner fin al superenfriamiento y mantener un equilibrio entre el potencial químico del agua intracelular y extracelular. Como resultado, la célula se deshidrata pero no se congela intracelularmente (Mazur, 1984). La deshidratación puede afectar a la organización celular y a las relaciones moleculares,

quedando en contacto componentes intracelulares que normalmente se encuentran separados. Finalmente, conforme aumenta el tamaño de los cristales de hielo, la pared celular puede resultar dañada debido a los cristales o a los elevados gradientes de concentración (Ri-Cheng, 2010).

Por otra parte, si la célula se congela muy rápidamente, no es capaz de eliminar el agua intracelular lo bastante rápido como para mantener un equilibrio, lo que provoca un incremento del superenfriamiento, y eventualmente se consigue alcanzar el equilibrio mediante la congelación del interior de la célula (Mazur, 1984).

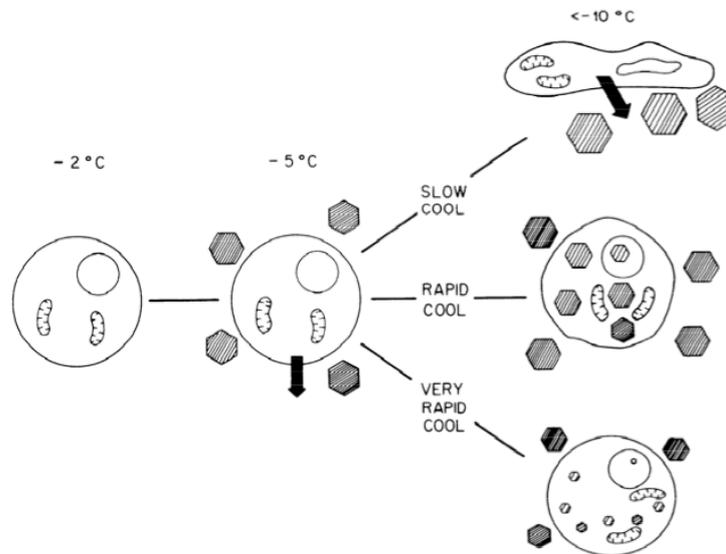


Figura 1. Acontecimientos físicos que ocurren en las células durante la congelación (Mazur, 1984).

El descenso de la temperatura también produce alteraciones en las membranas celulares, ya que tiene lugar un cambio de fase de los lípidos que la conforman, provocando la pérdida de fluidez, de dominios y un incremento de la oxidación lipídica. Como resultado, se produce una alteración en el transporte y metabolismo celular, además de una reducción de su capacidad de reparación (Watson y Morris, 1987). También se verán alterados la organización del citosol (Fuku *et al.*, 1995), el citoesqueleto (Dobrinsky, 1996), la condensación del DNA (Van Blerkom, 1989), la expresión génica (Boonkusol *et al.*, 2006) y el metabolismo (Dalcin *et al.*, 2013).

Las principales técnicas criobiológicas empleadas actualmente son la congelación y la vitrificación, las cuales difieren en la velocidad de enfriamiento, el alcance o no del equilibrio osmótico y en la formación de hielo o no durante el proceso de enfriamiento.

### 1.1 Congelación

El método de congelación se define como un enfriamiento lento y gradual, en el que tiene lugar la formación de hielo, un equilibrio osmótico y una disminución de la temperatura por debajo del punto de congelación.

Durante el proceso de congelación se forma hielo que contiene agua pura cristalizada, en la región restante no congelada, se encuentran las células y los solutos. Las concentraciones de azúcares, sales y crioprotectores aumentan, mientras que el volumen de la fracción no congelada disminuye.

El enfriamiento lento favorece el flujo de agua, minimizando de esta manera la formación de hielo intracelular. Conforme avanza el enfriamiento, la viscosidad de la fracción no congelada se vuelve demasiado elevada para que se produzca la cristalización, esta fracción se convierte en un sólido amorfo que no contiene cristales de hielo. En relación a la formación de hielo, cabe reseñar que no se inicia necesariamente en el punto de congelación. La nucleación de hielo espontánea ocurre en la mayor parte de los casos después de que la solución sufra un superenfriamiento a una temperatura entre los  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$ . A partir de ahí, rápidamente el hielo crece en todas las direcciones, y la liberación de calor latente provoca el calentamiento brusco de la muestra hasta alcanzar la temperatura de fusión/congelación de la solución. Los cristales que se formen tendrán distintos tamaños, siendo los más pequeños los que tengan un punto de fusión y congelación menor que los cristales de gran tamaño, debido a su gran tensión superficial. En este punto, la formación de hielo cesa, o tiene lugar a una velocidad controlada por el ratio al cual el calor de fusión es transportado desde la muestra (Özkavucku y Erdemli, 2002).

Los medios de congelación que se emplean, están compuestos por un crioprotector permeable a una concentración de  $1'5\text{M}$ , que suele ser dimetilsulfóxido, etilenglicol o glicerol, en un medio tampón fosfato suplementado con suero al 10-20% en volumen (Rall *et al.*, 1983).

Los programas de congelación, como muestra la Figura 2, se caracterizan por una primera rampa en la que la disminución de la temperatura es bastante rápida ( $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) hasta alcanzar los  $-7^{\circ}\text{C}$ . En la mayoría de los procesos de congelación, a temperaturas cercanas a los  $-7^{\circ}\text{C}$  se provoca la formación de hielo (*seeding*) para estabilizar la temperatura y así evitar los riesgos de un excesivo superenfriamiento del medio (Özkavucku y Erdemli, 2002). Después, el procedimiento continua con una segunda rampa más lenta ( $-0'3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) hasta alcanzar los  $-30^{\circ}\text{C}$ , y por último una tercer rampa más rápida ( $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) hasta alcanzar los  $-180^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se almacena la muestra en nitrógeno líquido (Liebermann *et al.*, 2003).

La descongelación de la muestra debe ser rápida, ésta se introduce en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta que esté parcial pero no completamente descongelada.

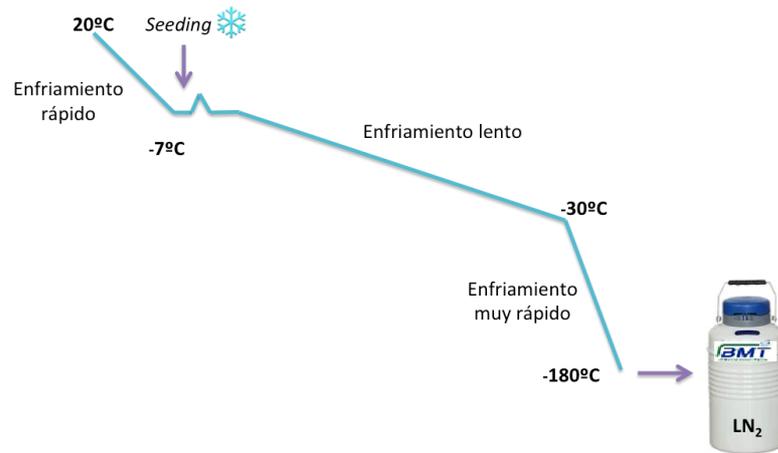


Figura 2. Programa de congelación caracterizado por 3 fases de disminución de la temperatura y la formación inducida de hielo.

## 1.2. Vitrificación

La vitrificación se define como la transición de una solución acuosa de un estado líquido a un estado vítreo sólido a una elevada viscosidad, bajas temperaturas, y sin la formación de cristales, evitando de esta manera los daños mecánicos que éstos producen en las células (Knoc *et al.*, 2014). Este proceso se caracteriza por la combinación de diferentes crioprotectores a elevadas concentraciones (4-5M), una variación osmótica en su adición y dilución, y un ratio de enfriamiento extremadamente rápido, entre 15.000 y 30.000 °C/min (Fahy y Rall, 2007; Kasai y Mukaida, 2004). A diferencia de la congelación, durante la vitrificación las células son deshidratadas principalmente antes del inicio del enfriamiento ultrarrápido por la exposición a elevadas concentraciones de crioprotectores, necesarias para obtener un estado vítreo. Además, tal y como se observa en la Figura 3, con este procedimiento se elimina el proceso de enfriamiento lento que tiene lugar durante la congelación y el equipamiento que lo controla. El principal problema asociado a la vitrificación son las altas concentraciones de crioprotectores que se emplean ya que resultan tóxicas para las células. Sin embargo, es posible reducir esta toxicidad combinando diferentes crioprotectores, de este modo disminuye la concentración relativa de cada crioprotector, y reduciendo el tiempo de exposición de las células a la solución (Rall y Fahy, 1985; Fahy y Rall, 2007).

El proceso general de vitrificación puede llevarse a cabo en un solo paso, suspendiendo directamente las células en la solución de vitrificación o puede realizarse en dos pasos, en este caso, primero las células son suspendidas en una solución de equilibrio con una concentración de crioprotectores menor que la solución de vitrificación, en la que las células se deshidratan y luego se rehidratan, después son expuestas a una solución de vitrificación por un período de tiempo corto y se introducen en nitrógeno líquido (Fahy y Rall, 2007). La desvitrificación se lleva a cabo mediante

un baño de agua a 20 o 37°C, la dilución y eliminación de los crioprotectores debe ser rápida debido a la elevada toxicidad.

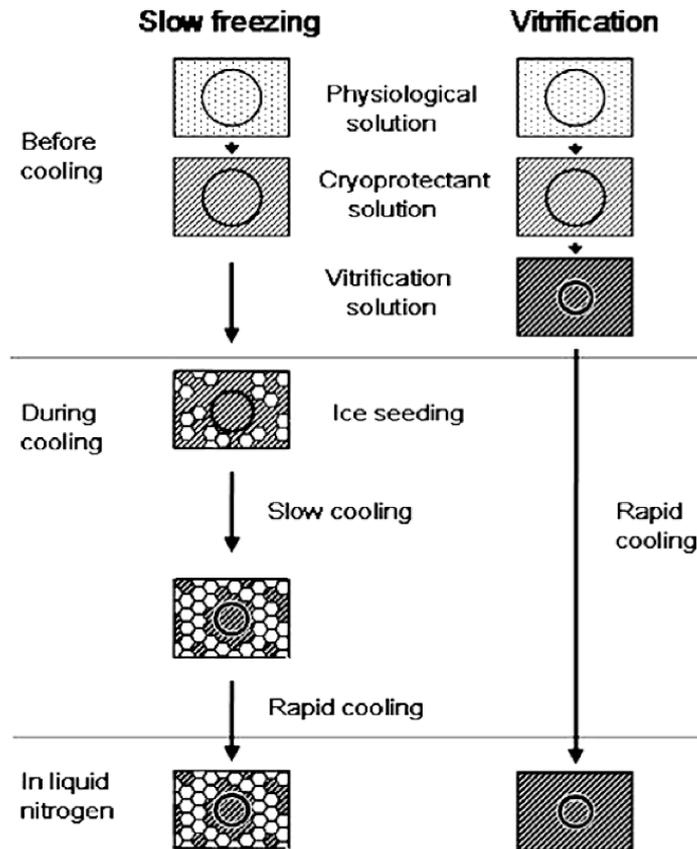


Figura 3. Proceso de congelación y vitrificación, antes del enfriamiento durante y una vez en nitrógeno líquido. Los hexágonos simbolizan la formación de cristales de hielo (Adaptada de Fahy y Rall, 2007).

## 2. Características físico-químicas de las soluciones de vitrificación.

Los crioprotectores son sustancias orgánicas que se utilizan en las soluciones de congelación y vitrificación con el objetivo de minimizar los daños celulares ocasionados en dichos procedimientos. A rasgos generales, los crioprotectores son capaces de reducir la velocidad de crecimiento de los cristales y de modificar su forma. Sin embargo, los crioprotectores resultan dañinos para la célula dependiendo de cuál sea su concentración, del tiempo de exposición ante la célula a temperatura ambiente y de la temperatura, mostrando más toxicidad cuanto mayor es la concentración, el tiempo de exposición y la temperatura (Liebermann *et al.*, 2003). Los principales problemas que ocasionan a las células son estrés osmótico en las membranas (Mazur, 1984), alteración de las interacciones proteicas (Fahy *et al.*, 1990), junto con desordenes del citoesqueleto (Vincent y Johnson, 1992) y alteraciones cromosómicas o sobre el DNA (Shaw *et al.*, 1991).

Dependiendo de cuál sea el lugar de actuación, intracelular o extracelular, los crioprotectores pueden clasificarse en permeables y no permeables.

## 1. Introducción

Los crioprotectores permeables son aquellos que entran en el interior de la célula, capaces de reducir los problemas ocasionados a las células por el efecto solución y la formación de cristales intracelulares, además disminuyen el punto de congelación hasta los  $-40^{\circ}\text{C}$ . Estos compuestos poseen un carácter hidrofílico y no electrolítico, con un fuerte efecto deshidratante como se observa en la Figura 4. Por otro lado, los crioprotectores no permeables son aquellos que actúan a nivel extracelular, mediante cambios en la presión osmótica que favorecen la deshidratación celular y probablemente, algunos de ellos, aportan protección a la membrana plasmática. Esta clase de crioprotectores está compuesta principalmente por disacáridos que resultan ser menos tóxicos que los permeables ya que no acceden al interior celular (Liebermann *et al.*, 2003).

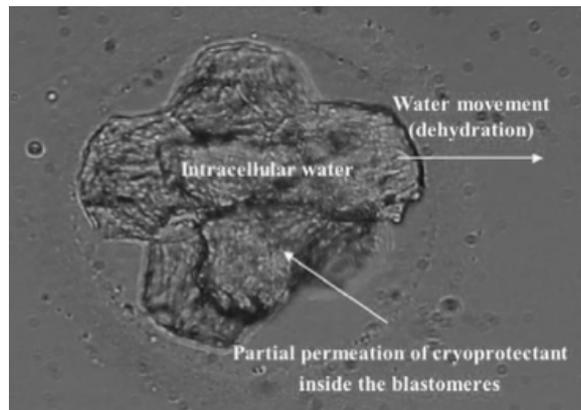


Figura 4. Embrión humano en estadio de 8 células, en una solución con un 10% de etilenglicol (EG) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO). Debido a la sustitución del agua intracelular por la mezcla EG/DMSO, tiene lugar una contracción volumétrica de cada una de las 8 blastómeras (Liebermann *et al.*, 2003).

Las soluciones que frecuentemente se utilizan en la vitrificación están compuestas por crioprotectores permeables como son etilenglicol (EG), glicerol (G), dimetilsulfóxido (DMSO) o propilenglicol (PG) en una concentración final mayor de 5M y crioprotectores no permeables como sacarosa o trehalosa en una concentración mayor de 0'5M (Knoc *et al.*, 2014). El DMSO fue uno de los primeros crioprotectores permeables utilizado para la vitrificación de embriones (Rall y Fahy, 1985). Sin embargo, al ser un solvente polar muy fuerte produce una elevada deshidratación celular, lo que probablemente contribuya a la mayor toxicidad que éste aporta a las soluciones (Ri-Cheng, 2010). Por esta razón, se han utilizado otros crioprotectores como el EG. Este crioprotector presenta una mayor estabilidad en la formación del estado vítreo en comparación con el DMSO. Sin embargo, para una misma concentración, el DMSO requiere ratios de enfriamiento menores que el EG para evitar la cristalización (Baudot *et al.*, 2000). De todos modos, debido a su baja toxicidad y a su rápida difusión a través de la zona pelúcida y la membrana celular, el EG es el crioprotector permeable más utilizado (Kasai *et al.*, 1990; Ali y Shelton, 1993; Emiliani *et al.*, 2000).

En algunos protocolos, los medios de vitrificación también son suplementados con macromoléculas como polietilenglicol, dextrano, ficoll o polivinilpirrolidona que actúan a nivel

extracelular (Lieberman *et al.*, 2002a). Al aumentar la viscosidad, las macromoléculas permiten llevar a cabo el proceso de vitrificación con concentraciones menores de crioprotectores.

En el caso de las soluciones de equilibrio, solamente se emplea un agente permeable o una combinación de éstos, en una concentración final máxima en torno a 3M (20% V/V), los más utilizados son el EG y el DMSO (Mochida *et al.*, 2013).

Para desvitrificar, se emplean soluciones con crioprotectores no permeables como la sacarosa en una concentración de 0'5 a 1M, para limitar la toxicidad del medio de vitrificación y las fluctuaciones osmóticas en la eliminación del crioprotector (Mochida *et al.*, 2013).

### 3. Limitaciones y retos de la crioconservación embrionaria.

La crioconservación de embriones de origen animal es una estrategia que permite no solamente ahorrar costes y espacio, sino también la preservación de una especie, línea o estirpe de su desaparición por desastres naturales o epizootias, o su alteración por erosión o deriva genética. Además, permite la difusión del proceso genético, incrementar las posibilidades de selección genética y establecer un banco de embriones de modo que se pueda reconstruir una población control y evaluar la eficacia de los métodos de selección (Mochida *et al.*, 2013).

En el caso de embriones humanos, su conservación es esencial para aquellos embriones sobrantes de un tratamiento de reproducción asistida tras la transferencia embrionaria (Matorras y Hernández, 2007).

Sin embargo, existen limitaciones para la conservación de determinados tipos embrionarios (estadios tempranos y producidos *in vitro*) que muestran, al igual que los óvulos, una mayor sensibilidad tanto al enfriamiento como a la exposición a los crioprotectores. Por ello que a partir de los procedimientos clásicos de congelación y vitrificación, se han desarrollado modificaciones tanto en los envases de almacenamiento cómo en el diseño de los medios de crioconservación.

#### 3.1 Estadios de desarrollo temprano.

Una de las limitaciones de la crioconservación embrionaria es el hecho de que embriones de una misma especie muestran diferente criotolerancia dependiendo de cuál sea su estadio de desarrollo. En el caso del ganado, se ha observado que el ratio de supervivencia de embriones producidos *in vivo* e *in vitro* es menor cuando se encuentran en estadios de desarrollo temprano, en comparación con aquellos que ya han alcanzado el estadio de mórula o blastocisto (Gajda y Smorag, 2009). Los embriones de desarrollo temprano son aquellos que se encuentran comprendidos entre los estadios de pronúcleo a 16 células, su crioconservación todavía no se ha conseguido llevar a cabo de manera eficiente en algunas especies, ya que se muestran más sensibles a la velocidad de

descenso de la temperatura, al estrés osmótico y las elevadas concentraciones de crioprotectores requeridas en las soluciones de vitrificación.

En estudios realizados en ratón, los estadios en los que mejores ratios de supervivencia se obtuvieron, después de la desvitrificación, fue el de 8 células y mórula (90-95% respectivamente). En los estadios de 2 y 4 células los ratios que se obtuvieron fueron un poco menores (77-80% respectivamente), mientras que en embriones de una sola célula solamente se alcanzó un 62% de desarrollo. En el caso del estadio de blastocisto, los ratios de supervivencia disminuyeron a medida que el blastocelo se va agrandando (de un 91% a un 57%) (Miyake *et al.*, 1993).

En el caso del conejo, Smorag *et al.* (1989) obtuvo los ratios de supervivencia *in vitro* más elevados en embriones vitrificados en estadio de mórula y blastocisto, en comparación con los ratios obtenidos en embriones de 1, 2 y 8-16 células. En concreto, empleando un medio de vitrificación con un 30% de propanodiol y un 30% de glicerol, no sobrevivió ninguno de los embriones de 1 y 2 células, en estadio de 8-16 células el ratio de supervivencia fue del 23%, en mórula y blastocisto los ratios obtenidos fueron de 82'7 y 78'5% respectivamente. Sin embargo, al emplear concentraciones de crioprotector más elevadas, 35% de propanodiol y 35% de glicerol, los ratios de supervivencia de los embriones de 1, 2 y 8-16 células mejoraron, obteniendo unos ratios del 20%, 43% y 92% respectivamente, aunque no se indica si las elevadas tasas de desarrollo alcanzado son al estadio de blastocisto. Por otra parte, en estudios realizados por Gajda (1996) se utilizó una solución de vitrificación con un 40% de etilenglicol, un 18% de Ficoll y 0'3M de sacarosa, en este caso para embriones de 1, 2 y 8-16 células se obtuvieron ratios de desarrollo tras 24 horas de cultivo de 68'6, 75'5 y 98% respectivamente. Sin embargo, no se observaron las tasas de desarrollo a blastocisto y en los estudios de supervivencia *in vivo*, sólo se evaluaron los estadios de 1 y 2 células siendo la tasa de nacidos del 5'1 y 7'5% respectivamente. Los mayores ratios de supervivencia *in vivo* en conejo (alrededor del 60%) se han obtenido cuando los embriones vitrificados se encuentran en estadio de mórula (Kasai *et al.*, 1992; Vicente y García-Ximenez, 1994).

### **3.2 Embriones producidos "in vitro".**

Varios estudios han mostrado que los embriones producidos *in vitro* no sobreviven a la crioconservación de igual manera a como lo hacen los producidos *in vivo* (Massip *et al.*, 1995; O'Kearney-Flynn *et al.*, 1998). Los embriones producidos *in vitro* son más sensibles al enfriamiento debido a su alto contenido en lípidos, el cual puede ser modificado por las condiciones del cultivo. La eliminación de lípidos por centrifugación aumenta su tolerancia al enfriamiento y la supervivencia *in vitro* de los embriones vitrificados/desvitrificados mejora después de la deslipidización (Esaki *et al.*, 2004).

### 3.3 Avances en el proceso de vitrificación.

Una de las maneras de mejorar el proceso de vitrificación consiste en la utilización de pequeños volúmenes, cuanto menor sean, habrá más probabilidades de que tenga lugar la vitrificación. Los volúmenes más reducidos permiten una transferencia de calor mejor, además de facilitar ratios de enfriamiento mayores (Saragusty y Arav, 2011). Se han desarrollado numerosos métodos para conseguir disminuir el volumen de la muestra. Estas técnicas pueden dividirse en dos categorías, técnicas superficiales y técnicas que emplean un envase tubular.

Algunos ejemplos de las técnicas superficiales más empleadas (Figura 5) son las rejillas para microscopía electrónica (EM) (Steponkus *et al.*, 1990), mínimo tamaño de gota (Yavin y Arav, 2001), *CryoTop* (Hamawaki *et al.*, 1999), *Cryoloop* (Lane *et al.*, 1999) y *Hemi-straw* (Vanderzwaem *et al.*, 2000) entre otras.

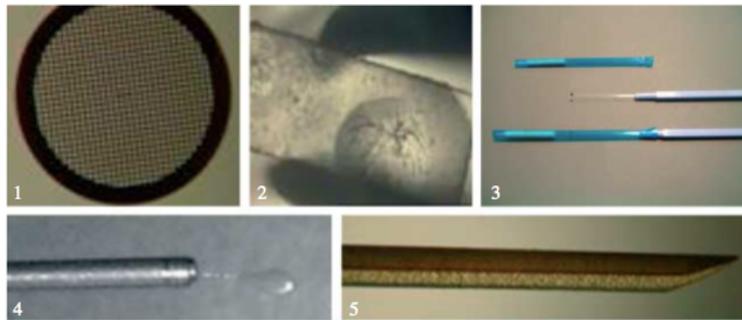


Figura 5. Soportes superficiales empleados en la vitrificación: (1) rejillas EM, (2) tamaño mínimo de gota, (3) *CryoTop*, (4) *Cryoloop*, (5) *Hemi-straw*. (Adaptada de Saragusty y Arav, 2011).

Por otro lado, las técnicas más utilizadas que emplean soportes tubulares (Figura 6) incluyen pajuelas de plástico (Rall y Fahy, 1985), pajuelas estiradas cerradas (Chen *et al.*, 2001), pajuelas estiradas abiertas (OPS) (Vajta *et al.*, 1997), *flexipet-denuding pipette* (Liebermann *et al.*, 2002b), OPS superfinas (Isachenko *et al.* 2003), dispositivo para la vitrificación de alta seguridad (Camus *et al.*, 2006) y *CryoTip* (Kuwayama *et al.*, 2005).

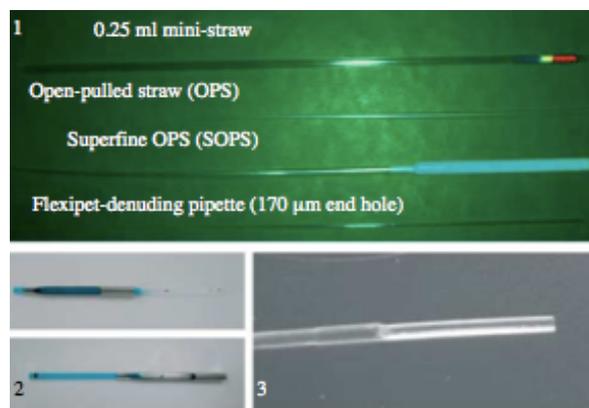


Figura 6. Soportes tubulares más utilizados para la vitrificación: (1) pajuelas de plástico, pajuelas estiradas abiertas (OPS), pajuelas estiradas abiertas superfinas (SOPS), *flexipet-denuding pipette*, (2) *CryoTip*, (3) dispositivo de vitrificación de alta seguridad. (Adaptada de Saragusty y Arav, 2011).

Descendiendo el volumen vitrificado y aumentando el ratio de enfriamiento se consigue un descenso moderado de la concentración de crioprotectores, minimizando de esta manera sus efectos tóxicos y osmóticos. Se ha demostrado en embriones de ratón de 4 células con blastómeras biopsiadas que aumentando el ratio de enfriamiento se consiguen mejorar los ratios de supervivencia embrionaria en un 37% (Lee *et al.*, 2007).

2

## Objetivos

---

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado fue definir tanto un medio de vitrificación de baja toxicidad en base a etilenglicol, dextrano y sacarosa como el soporte para la crioconservación de embriones de conejo de 8-16 células, evaluando la viabilidad *in vitro* de los embriones post-vitrificación tras 72 horas de cultivo y estudiando los niveles de expresión de los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* de los blastocistos obtenidos del cultivo.

# 3

## Material y Métodos

---

1. Diseño experimental
2. Animales
3. Recuperación de embriones
4. Solución y procedimiento de vitrificación
5. Desvitrificación y cultivo de embriones
6. Valoración de la viabilidad embrionaria
7. Evaluación de la expresión génica
8. Análisis estadístico

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. Diseño experimental

Los experimentos realizados se muestran de manera esquemática en la Figura 7.

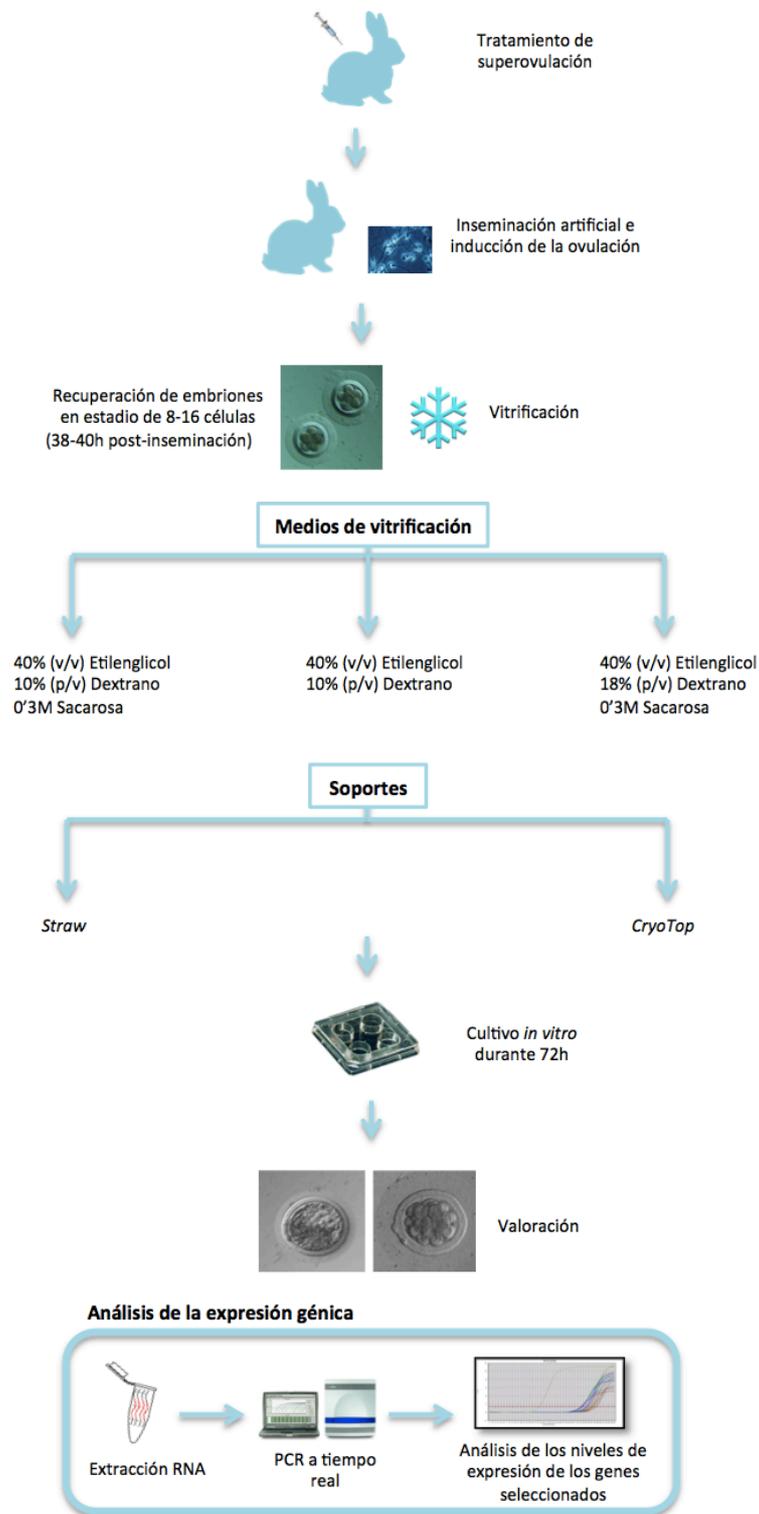


Figura 7. Esquema de los experimentos llevados a cabo.

Los embriones de conejo de 8-16 células fueron obtenidos a partir de hembras sometidas a un tratamiento de superovulación de 5 dosis administradas cada 12 horas. A continuación, 12 horas después de la última dosis, las hembras fueron inseminadas y 38-40 horas más tarde se procedió a la recuperación de los embriones a partir de la perfusión de los oviductos. El proceso de vitrificación se realizó empleando tres medios de vitrificación y dos soportes diferentes. Después de la desvitrificación, los embriones fueron cultivados *in vitro* durante 72 horas para su posterior valoración.

Por último, para los grupos control y de vitrificación con mejores ratios de desarrollo a blastocisto, se evaluó la viabilidad inmediata post-vitrificación mediante tinción vital fluorescente y se realizó un estudio de la expresión relativa de los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* sobre los blastocisto obtenidos del cultivo.

## 2. Animales

Los animales utilizados en este estudio provienen de la granja cunícula de la Universidad Politécnica de Valencia con nº de registro 250V091. Se emplearon 15 hembras de la línea A de origen Neozelandés blanco de 5 meses de edad y machos de la misma procedencia de 8 meses de edad para la realización de la inseminación artificial. Los conejos fueron albergados en jaulas convencionales (700 x 500 x 320 mm), con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura media mínima de 17'5°C y máxima de 25'5°C y una alimentación *ad libitum* con una dieta comercial.

Las hembras fueron sacrificadas a las 38-40 horas post-inseminación con una inyección de 0'6g de pentobarbital sódico en la vena marginal situada en la oreja (Doléthal®, Vétoquinol E.V.S.A., Madrid, España).

Una vez sacrificadas las conejas, se les extrajo el aparato reproductor para la posterior recuperación de los embriones.

## 3. Recuperación de embriones.

### 3.1. Tratamiento de superovulación.

Las hembras fueron sometidas a un tratamiento de superovulación con la hormona purificada FSH de origen porcino (FSHp; FOLLTROPIN™, Bioniche Teoranta, Galway, Ireland) y la hormona LH recombinante humana (LHrh; Luveris®, Serono, MW, London, UK). A cada coneja se le administraron 35 UI de FSHp combinada con 3'5 UI de LHrh, dividida en 5 dosis, de manera subcutánea cada 12 horas durante 3 días. Para alcanzar un volumen de 0'2 mL por dosis se realizó una dilución con suero fisiológico.

#### 3.2. Inseminación artificial.

Las hembras fueron inseminadas 12 horas después de la última dosis con 0'5 mL de esperma por coneja, cada muestra con aproximadamente un ratio de  $40 \times 10^6$  espermatozoides/mL en diluyente Tris - Citrato - Glucosa (0'25M Tris [hidroximetil aminometano] - 83mM Ácido cítrico – 47mM Glucosa).

Las muestras de semen se recogieron el mismo día de la inseminación empleando vaginas artificiales, siguiendo el método descrito por Vicente *et al.* (2011). A continuación, se examinó la movilidad de la muestra a temperatura ambiente con un microscopio óptico de contraste de fases a 400x, tras realizar una dilución 1:5 en Tris - Citrato - Glucosa. Además, también se realizó un recuento de anomalías y un cálculo de la concentración después de fijar la muestra en una solución 0'1% de formaldehído en tampón fosfato, empleando también un microscopio de contraste de fases a 400x. Solamente se utilizaron los eyaculados con una motilidad espermática mayor al 70% y una tasa de anomalías morfológicas inferior al 25%.

La inseminación se llevó a cabo empleando una cánula de plástico (22 cm) y un *pool* de semen heteroespérmico de tres machos de la misma línea no emparentados. Posteriormente, se indujo la ovulación con 1µg de acetato de buserelina (análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH).

#### 3.3. Obtención y catalogación de los embriones.

Para la recuperación de los embriones, los cuernos uterinos procedentes de las hembras se perfundieron con el medio tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS, Sigma, St Louis, MO, USA) suplementado con 0'1% (p/v) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St Louis, MO, USA) y atemperado a 37°C.

El líquido recogido de la perfusión se dispuso en placas Petri estériles, se recuperaron los embriones bajo una lupa binocular y se seleccionaron en base a su morfología y a su estadio de desarrollo embrionario. En este caso, se escogieron los embriones en estadio de 8-16 células que mostraran simetría y homogeneidad celular como los que aparecen en la Figura 8.

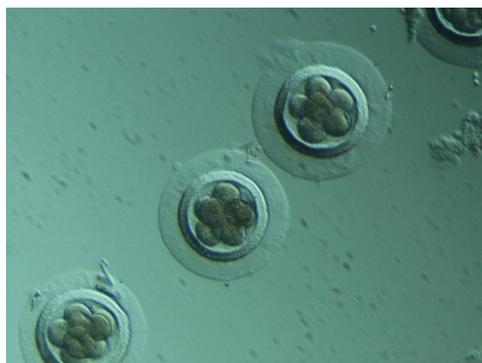


Figura 8. Embriones de conejo de 8-16 células, todos muestran simetría y homogeneidad celular.

#### 4. Solución y procedimiento de vitrificación.

Los procedimientos de vitrificación se realizaron mediante el empleo de 3 soluciones de vitrificación distintas en base a etilenglicol, dextrano (70.000 daltons) y sacarosa disueltos en medio base (MB; DPBS suplementado con 0'2% [p/v] de BSA y antibióticos [300.000 UI de penicilina G sódica, 700.000 UI de penicilina G procaína y 1.250 mg de sulfato de dihidroestreptomicina; Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España]). Las concentraciones de cada uno de ellos en las diferentes soluciones fueron:

1º 40% (v/v) etilenglicol, 10% (p/v) dextrano y 0'3M sacarosa

2º 40% (v/v) etilenglicol y 10% (p/v) dextrano

3º 40% (v/v) etilenglicol, 18% (p/v) dextrano y 0'3M sacarosa

Los embriones fueron vitrificados en dos pasos utilizando dos soportes (Figura 9): *straws* de plástico de 0'125 mL (91 mm, IMV, L'Aigle, France) y *CryoTops*. Los *CryoTops* están formados por una hoja plana rectangular de prolipropileno de 20 × 0'7 × 0'1 mm unida a un mango estrecho de 5 cm de longitud. Los utilizados en este trabajo fueron elaborados a partir de *straws*.

Para llevar a cabo el proceso de vitrificación, primero los embriones se sumergieron en 50 µl de la solución de equilibrio, formada por un 20% (v/v) de etilenglicol en MB, durante 3 minutos. Después, los embriones se trasladaron a una gota de 50 µl de la solución de vitrificación durante 30 segundos. A continuación, se cargaron en *straws* de plástico de 0'125 mL con 50 µl de la solución de vitrificación o 2 µl en el caso del *CryoTop* y se sumergieron en nitrógeno líquido. El tiempo de exposición de los embriones a la solución de vitrificación no debe superar el minuto. Ambos pasos se llevaron a cabo a 20°C.

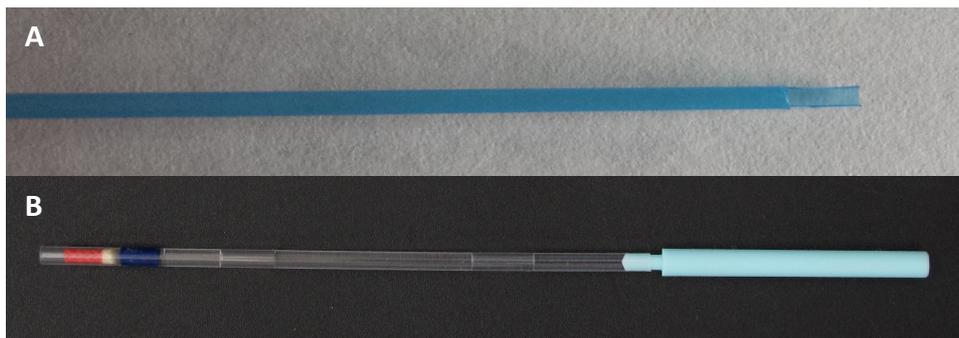


Figura 9. Soportes empleados en el proceso de vitrificación: (A) *CryoTop*, (B) *Straw*.

#### 5. Desvitrificación y cultivo de embriones.

La desvitrificación se realizó de acuerdo al soporte utilizado en el proceso de vitrificación. En el caso de *straws*, los embriones se sumergieron en un baño de agua a una temperatura de 20°C durante 10-15 segundos. La eliminación de la solución de vitrificación se efectuó en varios pasos. Primero, los embriones suspendidos en la solución de vitrificación (50 µl) fueron vertidos en una

gota de 850 µl de sacarosa 0'5M en MB. Después de 3 minutos, los embriones fueron transferidos a una gota de 50 µl de sacarosa 0'25M en MB, repitiendo este paso 2 veces más. Posteriormente, los embriones fueron lavados en MB.

Por otra parte, la desvitrificación de los embriones vitrificados mediante *CryoTop* se llevó a cabo mediante inmersión directa de la muestra en una gota de 50 µl de sacarosa 0'5M en MB a 25°C durante 3 minutos. A continuación, se transfirieron los embriones a una gota de sacarosa 0'25M en MB, repitiendo este proceso 3 veces. A continuación, los embriones se lavaron en MB antes de ser puestos a cultivar.

Por último, los embriones fueron trasladados a placas NUNC con 500 µl de medio de cultivo TCM199 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) y antibióticos (300.000 UI de penicilina G sódica, 700.000 UI de penicilina G procaína y 1.250mg de sulfato de dihidrostreptomycin; Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España) para su cultivo *in vitro* durante 72 horas hasta su valoración, en un incubador a una temperatura de 38'5°C y una atmosfera controlada con un 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación.

#### 6. Valoración de la viabilidad embrionaria.

Con el objetivo de evaluar la supervivencia de los embriones al proceso de vitrificación, se realizaron tinciones post-vitrificación con SYBR14 e yoduro de propidio (IP) para los grupos control y aquellos cuyos medios y soportes de vitrificación dieron los mejores resultados (vitrificación con el medio de 18% (p/v) de dextrano y 0'3M de sacarosa con *straw* y *CryoTop*). Para cada pocillo de 500µl que contenían de 15 a 20 embriones, se emplearon 5 µl de SYBR14 diluido y 5 µl de PI. Después de 5 minutos en oscuridad, los resultados fueron evaluados en un microscopio de fluorescencia.

#### 7. Evaluación de la expresión génica.

Para determinar si la vitrificación afecta a la calidad embrionaria, se evaluaron los niveles de expresión de los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* en embriones procedentes de los grupos control y de los grupos de vitrificación con el medio con un 18% (p/v) de dextrano y 0'3M de sacarosa con *straw* y *CryoTop*, además del medio con un 10% (p/v) de dextrano y 0'3M de sacarosa con *CryoTop*.

La elección de dichos genes se basa en el papel que éstos desempeñan tanto en el mantenimiento de la pluripotencia de las células embrionarias (Medvedev et al., 2008; Shi y Jin, 2010), como en un correcto desarrollo embrionario preimplantacional (Nichols et al., 1998). A continuación, se describen los distintos pasos realizados para llevar a cabo dicha evaluación.

### 7.1. Extracción y purificación del ARN mensajero (ARNm)

La extracción de ARNm se realizó a partir de grupos de aproximadamente 12 embriones en estadios de blastocisto y mórula compacta con el método de extracción Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Life Technologies™ Corporation, Carlsbad, USA), siguiendo el protocolo que muestran la **Figura 10**.

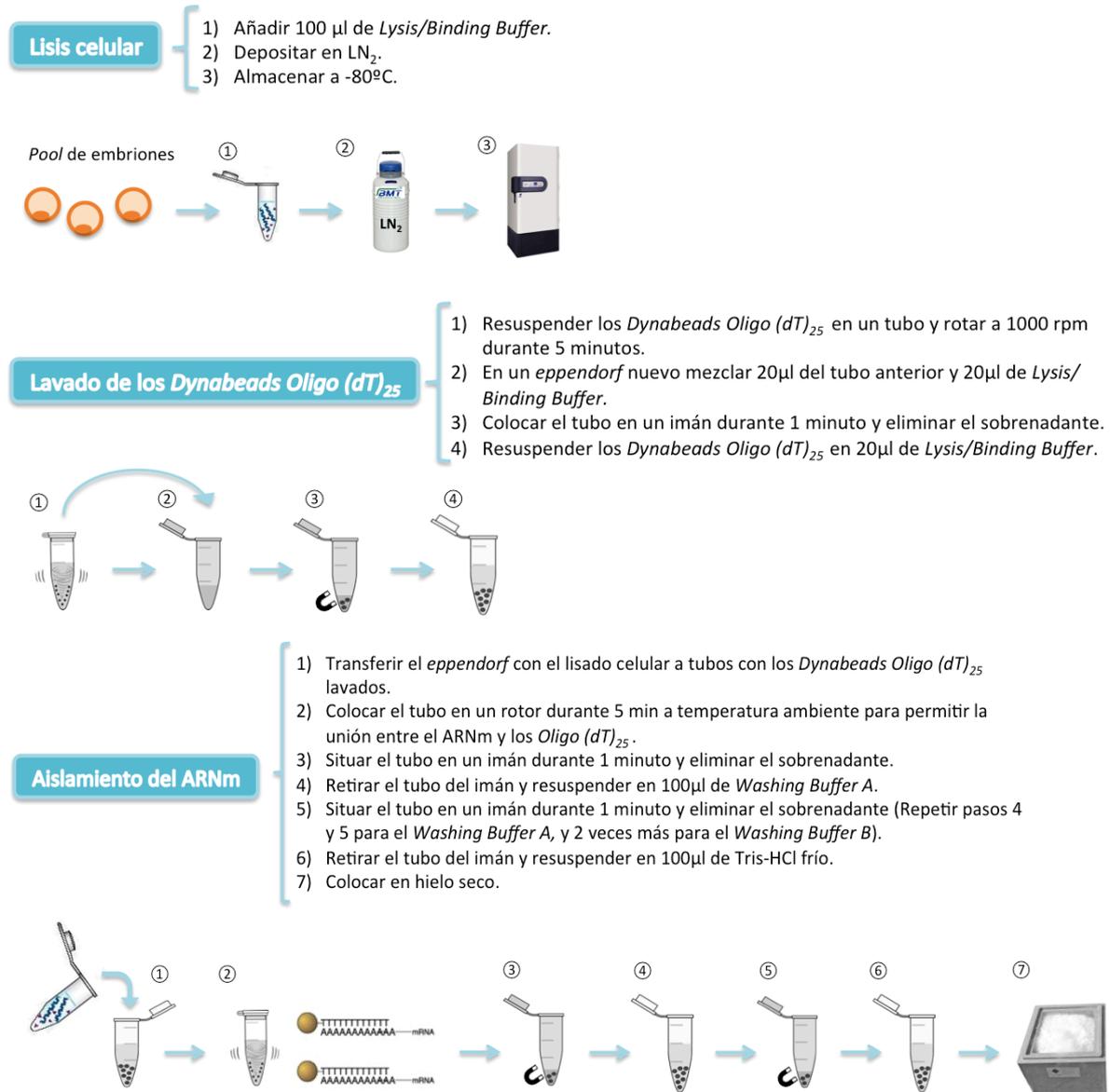


Figura 10. Pasos a seguir para realizar la extracción de ARNm con el método de extracción Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit.

Este sistema se basa en el uso de bolas superparamagnéticas con secuencias oligo (dT)<sub>25</sub> unidas covalentemente a su superficie. El método de separación depende del apareamiento de bases entre la cola poli A del extremo 3' de la mayoría de los ARNm y los oligos (dT)<sub>25</sub>. Otros tipos de ARN que no presentan cola poli A no hibridarán con las bolas y serán inmediatamente eliminados con los lavados.

**7.2. Obtención del ADN complementario (ADNc).**

La retrotranscripción se realizó con el kit Quantitect® III Reverse Transcription (Qiagen®, Alameda, CA, USA), utilizando las instrucciones proporcionadas por el fabricante y el programa de temperaturas que aparece en la **Tabla 1**.

*Tabla 1. Programa de tiempos y temperaturas proporcionado por el fabricante para llevar a cabo la retrotranscripción.*

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Descripción del proceso
2	42	Incubación con nucleasas para eliminar la posible contaminación con ADN genómico
15	42	Incubación con la transcriptasa reversa y los <i>random primers</i>
3	95	Inactivación de la transcriptasa reversa

El volumen final de reacción fue de 20 µL. Una vez finalizada la retrotranscripción, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

**7.3 Determinación de la especificidad y la eficiencia de amplificación.**

Las secuencias de los *primers* utilizados en este análisis se extrajeron de la bibliografía para *OCT4* y *SOX2* (Mamo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007), en el caso de *NANOG*, los *primers* se pusieron a punto en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Politécnica de Valencia. Además, se evaluó la histona *H2AFZ* (Miembro Z de la familia de histonas H2A; Mamo *et al.*, 2008) y la enzima *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; Navarrete-Santos *et al.*, 2007) como genes *housekeeping* de referencia. Las características de los *primers* empleados se encuentran resumidas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de los primers utilizados.

	Código GenBank	Secuencias de los primers	Fragmento amplificado (pb)
H2AFZ	AF030235	Fw - 5' AGAGCCGGCTGCCAGTTCC	85
		Rv - 5' CAGTCGCGCCACACGTCC	
GAPDH	L23961	Fw - 5' GCCGCTTCTTCTCGTGCA	144
		Rv - 5' ATGGATCATTGATGGCGACAACAT	
OCT4	NM_001099957	Fw - 5' CGAGTGAGAGGCAACTTGG	125
		Rw - 5' CGGTTACAGAACCACACACG	
SOX2	NM_003106	Fw - 5' AGCATGATGCAGGAGCAG	270
		Rw - 5' GGAGTGGGAGGAAGAGGT	
Nanog-1	ENSOCUT00000013777	Fw - 5' CCAGGTGCCTTACAGACA	104
		Rw - 5' TCACTACTCTGGGACTGGGA	

Para comprobar la especificidad de la reacción de PCR se realizó un análisis de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% empleando como patrón de tamaños TrackIt™ 50 bp DNA Ladder (Invitrogen). La PCR común se llevó a cabo siguiendo las condiciones de la **Tabla 3** y el protocolo de tiempos y temperaturas de la **Tabla 4**. Posteriormente, la electroforesis se desarrolló manteniendo un voltaje constante (80V) durante 55 minutos. A continuación, se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta.

Tabla 3. Reactivos con las cantidades correspondientes utilizados para la PCR común.

Reactivo	Cantidad
HotStartTaq Master Mix (Qiagen® Alameda, CA, USA)	5 µL
Primer Forward (5µM)	1 µL
Primer Reverse (5µM)	1 µL
Agua	2 µL
cDNA (Dilución 1:5)	1 µL
<b>Volumen Total</b>	<b>10 µL</b>

Tabla 4. Protocolo de tiempos y temperaturas empleados en la PCR.

Proceso de PCR	Tiempo	Temperatura
Activación de la DNA Polimerasa HotStartTaq	15 min	95 °C
<b>40 ciclos:</b>		
Desnaturalización	30 s	95 °C
Unión <i>primers</i>	30 s	60 °C
Extensión	30 s	72 °C
Hibridación de las cadenas	10 min	72 °C

Por otra parte, se evaluó la eficiencia de cada pareja de *primers* realizando una PCR a tiempo real (qPCR) a partir de un *pool* de embriones. La eficiencia de la qPCR es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de DNA en cada uno de los ciclos (Bustin y Nolan, 2004). Para ello, se realizaron varias diluciones seriadas: 1/8, 1/32, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 para cada uno de los *primers*. La eficiencia de la reacción se calculó a partir de la pendiente de la recta patrón que se obtiene de la representación del logaritmo de la concentración de DNA inicial frente el Ct (ciclo umbral o *threshold cycle*) de cada ciclo, que es la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral. Para el calculo de la eficiencia se empleó la Ecuación 1:

$$E = (10^{[-1/pendiente]}) \quad (\text{Ec. 1})$$

#### 7.4. Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real.

Para el análisis de los genes seleccionados se realizó una qPCR en el termociclador modelo 7500 de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Para cada reacción se emplearon 5  $\mu\text{L}$  de ADNc diluido 1:20, 1  $\mu\text{L}$  de cada uno de los *primers* a 5  $\mu\text{M}$  (Tabla 2), 2  $\mu\text{L}$  de la referencia pasiva ROX™ (6-carboxy-X-rhodamine), 1  $\mu\text{L}$  de agua y 10  $\mu\text{L}$  de la solución Power SYBR® Green PCR Master Mix (Fermentas GmbH).

Una vez finalizada la qPCR, se realizó una curva de disociación del producto amplificado para comprobar la ausencia de amplificaciones no específicas, contaminaciones o *primer dimers*.

El programa de tiempos y temperaturas empleado se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Programa de tiempos y temperaturas utilizado en la qPCR.

	Proceso	Tiempo	Temperatura
Pasos iniciales	Activación de la ADN Polimerasa	2 min	50 °C
		10 min	95 °C
PCR (40 ciclos)	Desnaturalización	15 s	95 °C
	Hibridación/extensión	30 s	60 °C
Curva de disociación		15 s	95 °C
		1 min	60 °C
		15 s	95 °C

Para normalizar la expresión de los diferentes genes, se utilizaron los dos genes *housekeeping* y un calibrador para poder ajustar las variaciones de un ensayo a otro. El calibrador se generó a partir de un *pool* de todas las muestras en una dilución 1:32. La cuantificación de los niveles relativos de expresión génica se realizó utilizando la Ecuación 2 (Weltzien et al., 2005):

$$Ratio N. = E_{f_{Target}}^{(Ct\ calibrado - Ct\ muestra)} \cdot E_{f_{Housekeeping}}^{(Ct\ muestra - Ct\ calibrador)} \quad (\text{Ec. 2})$$

## 8. Análisis estadístico

Para analizar los datos procedentes de la vitrificación con los distintos medios y soportes se utilizó el paquete estadístico SPSS 16.0. Las tasas de desarrollo se analizaron mediante una función binomial *probit link* en lo que se incluyó como factores fijos sesión, medio (los 3 descritos) y soporte (*straw* y *CryoTop*) y, la interacción del medio y el soporte. Mientras que la viabilidad post-vitrificación y la tasa de desarrollo embrionario entre el medio más efectivo de vitrificación y el control fue analizada mediante una Chi-cuadrado con corrección de Yates.

Por otra parte, para el análisis estadístico realizado con los datos obtenidos de la expresión génica relativa, se comprobó primero que éstos se ajustaran a una distribución normal. En el caso de que no fuera así, se ajustaron mediante una transformación logarítmica antes del análisis de varianza en el que se incluyó como efecto fijo el tipo de embrión (control, vitrificado 10% de dextrano y vitrificado 18% de dextrano).

# 4

## Resultados y Discusión

1. Desarrollo *in vitro* de los embriones vitrificados.
2. Viabilidad de los embriones al proceso de vitrificación.
3. Efecto de la vitrificación sobre la expresión génica.

## 4. RESULTADOS

### 1. Desarrollo *in vitro* de los embriones vitrificados con los diferentes medios y soportes.

Para la elaboración del presente estudio se emplearon 15 hembras y un total de 889 embriones. La tasa de ovulación fue de  $76'87 \pm 23'18$  (media  $\pm$  desviación típica) por hembra. El porcentaje de embriones recuperados respecto al total de embriones y óvulos fue de 84'77%, siendo el número embriones recuperados de  $63'07 \pm 21'61$  (media  $\pm$  desviación típica) por hembra.

El desarrollo de los embriones fue valorado después de 72 horas de cultivo, y según el estadio alcanzado los embriones fueron clasificados como mórula (Figura 11) o blastocisto (Figura 12).



Figura 11. Mórulas de conejo a las 72h de cultivo *in vitro*. Imagen tomada con un microscopio óptico.



Figura 12. Blastocisto de conejo a las 72 h de cultivo *in vitro*. Imagen tomada con un microscopio óptico.

El total de embriones desarrollados (mórulas y blastocistos) tras ser vitrificados y cultivados *in vitro* 72 h se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Embriones en desarrollo obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de embriones vitrificados en diferentes condiciones.

	<i>Straw</i> (lsm $\pm$ es)	<i>CryoTop</i> (lsm $\pm$ es)	Total medios (lsm $\pm$ es)
10% Dextrano y 0'3M sacarosa	0'32 $\pm$ 0'043 <sup>b</sup> (173)	0'48 $\pm$ 0'058 <sup>a</sup> (148)	0'40 $\pm$ 0'034 <sup>B</sup> (321)
10% Dextrano sin sacarosa	0'16 $\pm$ 0'038 <sup>c</sup> (130)	0'29 $\pm$ 0'050 <sup>b</sup> (133)	0'22 $\pm$ 0'035 <sup>C</sup> (263)
18% Dextrano y 0'3M sacarosa	0'53 $\pm$ 0'059 <sup>a</sup> (132)	0'48 $\pm$ 0'058 <sup>a</sup> (173)	0'51 $\pm$ 0'046 <sup>A</sup> (305)
<b>Total soportes (lsm <math>\pm</math> es)</b>	0'32 $\pm$ 0'031 <sup>B</sup> (435)	0'41 $\pm$ 0'042 <sup>A</sup> (454)	0'37 $\pm$ 0'029 (889)

lsm  $\pm$  es: medias ajustadas por mínimos cuadrados  $\pm$  error estándar de los datos.

<sup>A,B,C</sup> Valores en las columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente ( $P < 0'05$ ) por el efecto del medio, en el caso de las filas difieren por el efecto del soporte.

<sup>a,b,c</sup> Valores en las columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente ( $P < 0'05$ ) por el efecto de la interacción entre el medio y el tipo de soporte.

La Tabla 7 muestra sólo los datos correspondientes al desarrollo a blastocistos de los embriones vitrificados.

Tabla 7. Blastocistos obtenidos a partir del cultivo in vitro de embriones vitrificados en diferentes condiciones.

	<i>Straw</i> (lsm ± es)	<i>CryoTop</i> (lsm ± es)	Total medios (lsm ± es)
10% Dextrano y 0'3M sacarosa	0'17 ± 0'033 <sup>b</sup> (173)	0'33 ± 0'058 <sup>a</sup> (148)	0'24 ± 0'031 <sup>A</sup> (321)
10% Dextrano sin sacarosa	0'08 ± 0'027 <sup>d</sup> (130)	0'20 ± 0'045 <sup>b,c</sup> (133)	0'13 ± 0'028 <sup>B</sup> (263)
18% Dextrano y 0'3M sacarosa	0'32 ± 0'056 <sup>a,c</sup> (132)	0'31 ± 0'057 <sup>a,c</sup> (173)	0'32 ± 0'045 <sup>A</sup> (305)
<b>Total soportes</b> (lsm ± es)	0'17 ± 0'025 <sup>A</sup> (435)	0'28 ± 0'040 <sup>B</sup> (454)	0'23 ± 0'031 (889)

lsm ± es: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar de los datos.

<sup>A,B</sup> Valores en las columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente ( $P < 0'05$ ) por el efecto del medio, en el caso de las filas difieren por el efecto del soporte.

<sup>a,b,c,d</sup> Valores en las columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente ( $P < 0'05$ ) por el efecto de la interacción entre el medio y el tipo de soporte.

Los resultados obtenidos, mostrados en la Tabla 6 y Tabla 7, señalan que el medio con el que se alcanzan los mejores niveles de desarrollo embrionario es el que contiene una mayor cantidad de dextrano (18%) y sacarosa, tanto para embriones en desarrollo como sólo para blastocisto ( $0'51 \pm 0'046$  y  $0'32 \pm 0'045$  respectivamente). No obstante, cuando se compara con las tasas de desarrollo obtenidas con el grupo control sin vitrificar, se observa que éstas fueron significativamente inferiores al grupo control (45'0% de embriones desarrollados y 26'3% de blastocistos de 305 embriones vitrificados vs respectivamente 85'5% y 70'5% de 170 embriones control,  $P < 0'05$ ). Estos resultados sugieren que al aumentar la viscosidad de la mezcla de vitrificación con dextrano, no se incrementan los efectos nocivos asociados a la toxicidad y la hiperosmolaridad de estos medios, si no que favorece la supervivencia de los embriones en estadios de 8 a 16 células de conejo.

Los polímeros de elevado peso molecular como son el dextrano o el ficoll, ejercen un papel protector sobre las células no del todo conocido. Meryman (1966) fue el primero en atribuirles una función de prevención del daño osmótico producido durante la rápida deshidratación celular, junto con la habilidad de cubrir las células formando una matriz viscosa que proporcionaría protección a la membrana celular. De hecho, estudios realizados en embriones de conejo por Viudes De Castro *et al.* (2010) mostraron que al añadir dextrano a la solución de vitrificación disminuía la incidencia de daño o rotura en la capa de mucina. Estos polímeros consiguen dichos efectos modificando las propiedades de las soluciones de vitrificación a través de una reducción significativa de la

concentración de crioprotectores necesarios para alcanzar la vitrificación (Liebermann *et al.*, 2003). Además, al aumentar la concentración de estas macromoléculas, se produce un incremento de la viscosidad de la solución, aumentando también la temperatura de transición vítrea. A concentraciones moderadas, la solución puede volverse demasiado viscosa para que tenga lugar la formación de cristales de hielo (Kuleshova *et al.*, 2001). El efecto de dichos polímeros sobre la tasa de supervivencia de los embriones, fue evaluado por Popelková *et al.* (2009) que compararon los ratios de cultivo *in vitro* hasta blastocisto de embriones de conejo de 8-12 células vitrificados con una solución con EG y una solución con EG y ficoll. El grupo de embriones vitrificados con la solución con EG y ficoll mostró unos ratios más altos (63%) que en el caso de los vitrificados con la solución solo con EG (22'5%).

Atendiendo a los resultados obtenidos, podría plantearse en un próximo trabajo incrementar el contenido de dextrano y, probablemente, reducir la concentración de etilenglicol manteniendo las propiedades del medio de vitrificación y reduciendo la toxicidad derivada del crioprotector permeable (etilenglicol).

Respecto la adición de azúcares a los medios de vitrificación, en el presente estudio se obtuvieron mejores resultados al emplear soluciones con sacarosa. Para el medio con un 10% de dextrano y 0'3M de sacarosa se obtuvo una tasa de embriones en desarrollo y blastocistos más alta que para el medio con un 10% de dextrano. De nuevo, al igual que el dextrano, la sacarosa y otros disacáridos no permeables, aumentan la viscosidad del medio y protegen la membrana celular, aunque contribuyen de manera importante a elevar la osmolaridad del medio.

En cuanto al soporte, sin tener en cuenta el medio utilizado, se obtuvieron mejores resultados con el envase *CryoTop* tanto para embriones en desarrollo como para blastocistos, en lugar de *straw*. Aunque en algunas combinaciones de medio y soporte, como en el caso del medio de 18% de dextrano y sacarosa no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la utilización de ambos envases o soportes, tanto en embriones en desarrollo como en blastocistos. El *CryoTop* presenta la ventaja de requerir un volumen de vitrificación menor, lo que mejora la transferencia de calor, además de facilitar elevados ratios de enfriamiento. Por otra parte, el *straw* es un sistema cerrado que permite una manipulación más fácil, segura y si es necesario de mayores cantidades de embriones (Saragusty y Arav, 2011). Además, su extendido uso se debe a la rápida transmisión de los cambios de temperatura exteriores al medio de vitrificación, a través de su pared (Mochida *et al.*, 2013). Actualmente, el *CryoTop* es uno de los envases más utilizados en la vitrificación tanto de embriones humanos como de diferentes especies animales (Shi *et al.*, 2012; Ushijima *et al.*, 2004; Hochi *et al.* 2004)

## 2. Viabilidad de los embriones al proceso de vitrificación.

Se evaluó la viabilidad de 45 embriones vitrificados con *straw*, 40 con *CryoTop* y 30 controles, con la doble tinción de SYBR14 y IP. Se determinó que la viabilidad estimada mediante la integridad de la membrana de las blastómeras es similar entre los grupos analizados. En el caso de los controles, como muestran la Figura 13 y la Figura 14, todos los núcleos de los embriones se tiñeron con SYBR14 y no con IP, demostrando de esta manera la integridad de la membrana de todas sus blastómeras (30/30, 100%).

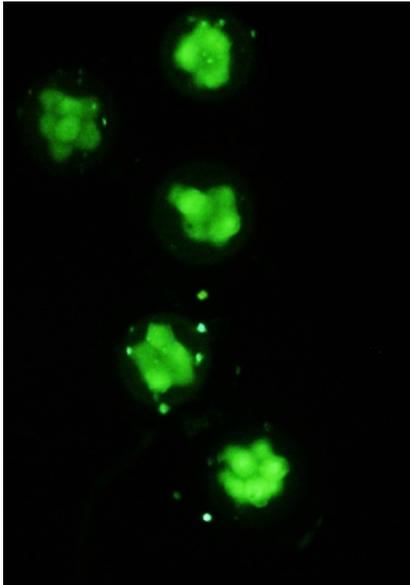


Figura 13. Embriones de conejo de 8-16 células pertenecientes al grupo control. Todas sus blastómeras se han teñido solamente con SYBR14 lo que prueba su viabilidad. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia.

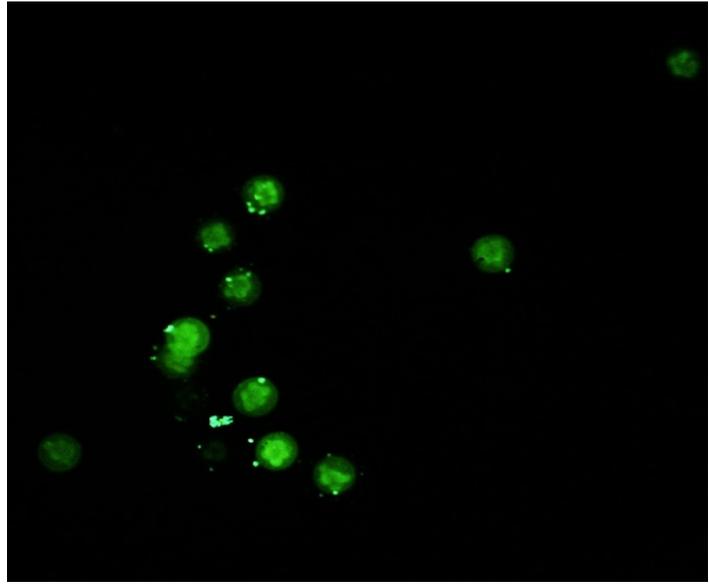


Figura 14. Embriones de conejo de 8-16 células pertenecientes al grupo control. Cada una de sus blastómeras emite fluorescencia verde debido a la tinción con SYBR14. La ausencia de fluorescencia de color rojo demuestra la viabilidad celular. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia.

En cuanto a los embriones vitrificados con *straw*, empleando como medio de vitrificación el medio con un 18% de dextrano y sacarosa, el 91'2% de los embriones no mostraron ninguna blastómera teñida con IP, solamente 4 (8'8%) de ellos mostraron daños en la membrana de algunas de sus blastómeras como es el caso del embrión que aparece en la Figura 15. El resto de embriones, mostraron todas sus blastómeras de color verde, indicando de esta manera, la supervivencia de todas ellas, como los que se muestran en la Figura 16.

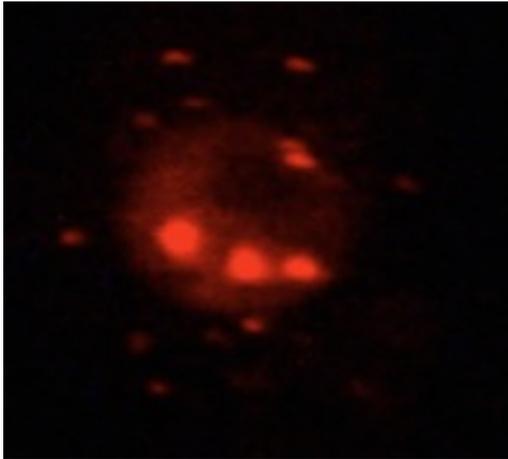


Figura 15. Embrión de conejo de 8-16 células vitrificado con straw, parcialmente dañado, ya que 3 de sus blastómeras se han teñido con IP. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia con el filtro que solamente permite ver la fluorescencia de color rojo.

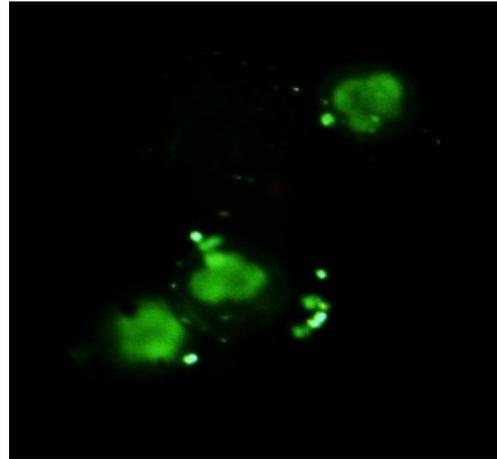


Figura 16. Embriones de conejo de 8-16 células vitrificados con straw, todas sus blastómeras se han teñido solamente con SYBR14, demostrando así la viabilidad de las mismas. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia.

Para los embriones vitrificados con *CryoTop* y un medio de vitrificación de un 18% de dextrano y sacarosa, el 85% de los embriones no presentaron ninguna de sus blastómeras con daños en sus membranas, tan sólo 5 de los 40 embriones (12'5%) mostraron todas sus blastómeras dañadas, mientras que solamente uno de ellos presentaba daños en algunas de sus blastómeras, como se observa en la Figura 17 y Figura 18. En total el porcentaje de embriones dañados fue del 15% (6/40).

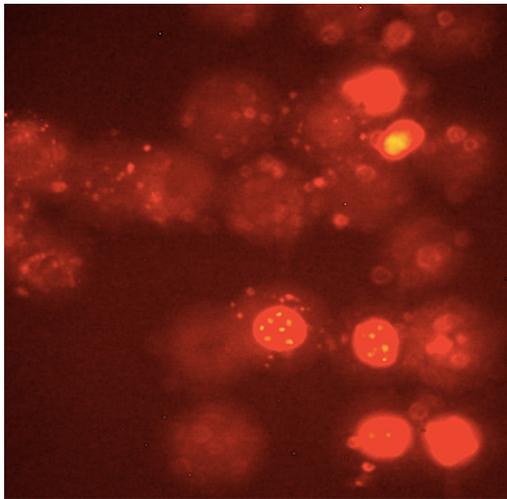


Figura 17. Embriones de conejo de 8-16 células, vitrificados con *CryoTop*, se observan 5 embriones dañados, ya que los núcleos de sus blastómeras han sido teñidos con IP. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia solamente con el filtro para observar la tinción roja.

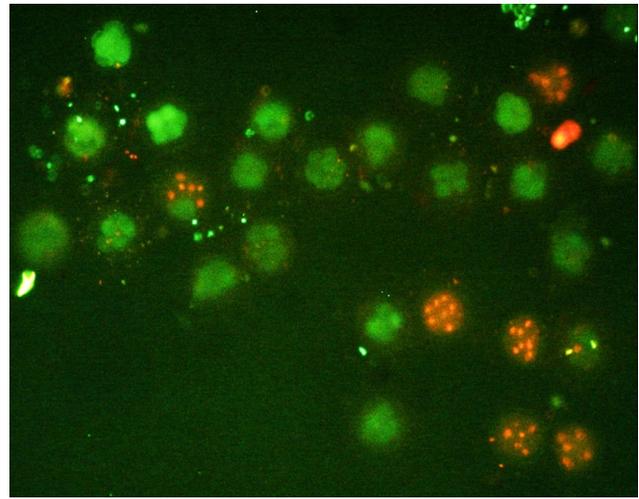


Figura 18. Embriones de conejo de 8-16 células, vitrificados con *CryoTop*, se observan 5 embriones dañados y uno parcialmente dañado durante el proceso de vitrificación. Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia con los filtros para observar ambas tinciones.

Los datos de viabilidad obtenidos para los tres grupos evaluados se encuentran representados en la Figura 19.

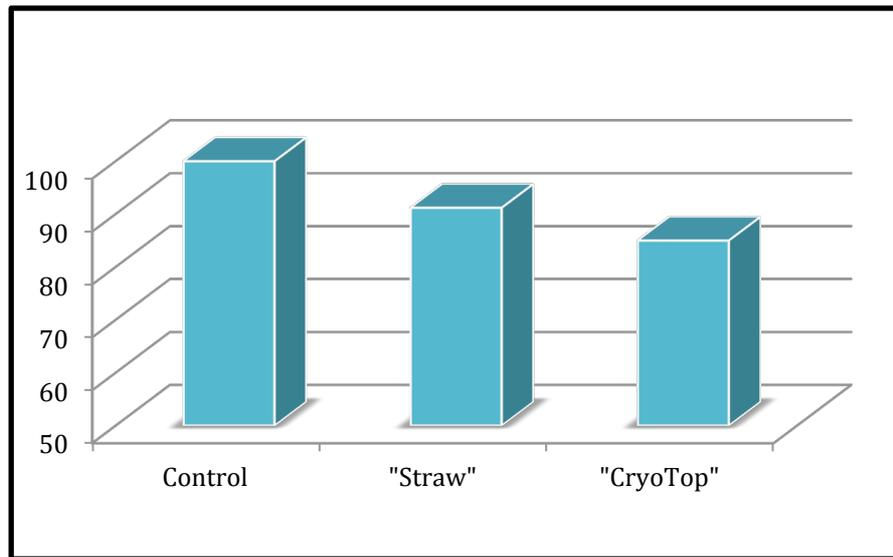


Figura 19. Viabilidad obtenida para los distintos grupos analizados: Control, vitrificados con straw y vitrificados con CryoTop.

En estudios realizados por Coutinho *et al.* (2006) en los que se evaluó como la vitrificación en un medio 40% EG - 18% Ficoll - 10% sacarosa puede afectar a la integridad de la membrana de embriones de ratón en estadio de mórula y blastocisto, observaron que el  $69.7\% \pm 3.9\%$  de los 75 vitrificados resultaban dañados frente el  $13.8\% \pm 3\%$  de los 62 embriones del grupo control.

Los resultados del presente estudio muestran un ratio de supervivencia mayor a los obtenidos por Coutinho *et al.* (2006) a pesar de utilizar soluciones de vitrificación muy similares. La diferencia en los datos obtenidos puede residir en el hecho de que se trata de especies distintas y probablemente en la diferencia del estadio embrionario. Aunque estadios tardíos suelen ser más tolerantes a los procedimientos de vitrificación.

### 3. Efecto de la vitrificación sobre la expresión génica.

#### 3.1. Evaluación de la especificidad de amplificación de la reacción de PCR.

Se comprobó la especificidad de cada par de *primers* utilizado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 20). Las bandas obtenidas se compararon con los tamaños teóricos de los fragmentos amplificados para cada par de *primers* que aparecen en la Tabla 2 del apartado *Material y Métodos*.

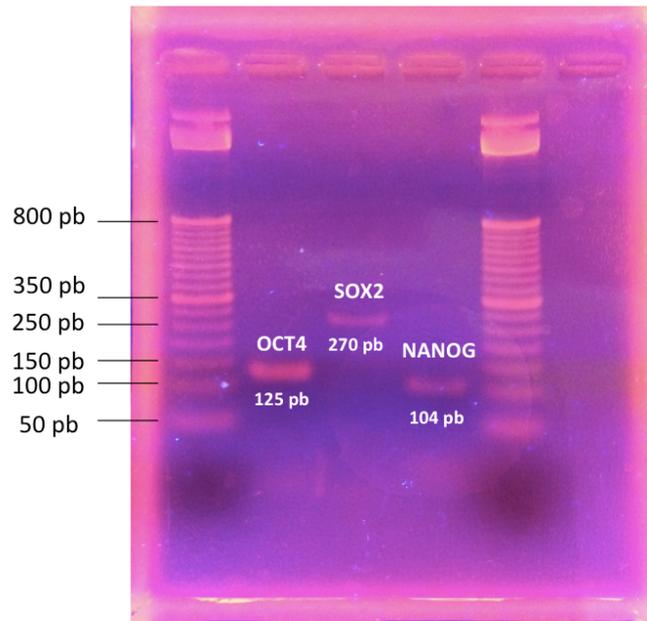


Figura 20. Gel de agarosa al 2% con los productos de la amplificación de los primers utilizados para los genes OCT4, SOX2 y NANOG para realizar la PCR.

Por otra parte, la curva de disociación realizada después de la qPCR permite detectar la posible presencia de amplificaciones no específicas que puedan haber afectado a los datos de fluorescencia obtenidos. En la Figura 21 se muestra la curva de disociación para los *primers* del gen NANOG.

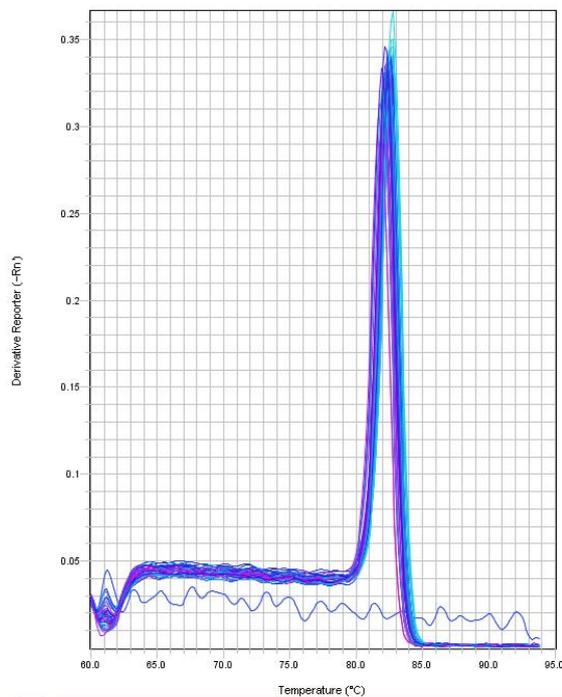


Figura 21. Curva de disociación del producto amplificado con los primers de NANOG tras la PCR a tiempo real. Se encuentra representada la temperatura de disociación ( $T_m$ ) frente a la derivada de la fluorescencia. Se observa que solamente se ha producido la amplificación de un único fragmento.

Se puede observar que solo ha habido la amplificación de un fragmento, a una temperatura de disociación ( $T_m$ ) de 82'5 – 83 °C. Un único pico a una misma temperatura indica la presencia de un único producto de amplificación, ya que la  $T_m$  depende del número de bases del fragmento. La especificidad de los *primers* queda comprobada ya que la señal correspondiente al blanco permanece a niveles bajos y constantes. Para los *primers* del resto de genes: *SOX2*, *OCT4*, *GAPDH* y *H2AFZ* se obtuvieron curvas de disociación muy similares.

### 3.2. Valoración de la eficiencia de amplificación de la reacción de PCR.

La **Figura 22** muestra las rectas obtenidas a partir de las diluciones seriadas. En ellas se representa el logaritmo de la concentración inicial de ADNc frente al ciclo umbral o *Ct*. A partir de la pendiente de cada una de las rectas y aplicando la Ecuación 1 del apartado de *Material y Métodos*, se obtuvo la eficiencia de la reacción de PCR para cada uno de los genes. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Eficiencias obtenidas para la reacción de PCR de cada uno de los genes.

Gen	Pendiente	Correlación ( $R^2$ )	Eficiencia
<i>H2AFZ</i>	-3'392	0'99	1'97
<i>GAPDH</i>	-3'638	0'99	1'88
<i>NANOG</i>	-3'398	0'99	1'97
<i>OCT4</i>	-3'556	0'99	1'91
<i>SOX2</i>	-3'478	0'99	1'94

Los resultados de eficiencia obtenidos se encuentran dentro del rango exigido (1'8 – 2'2), por tanto, se puede considerar que la amplificación fue correcta.

## 4. Resultados y Discusión

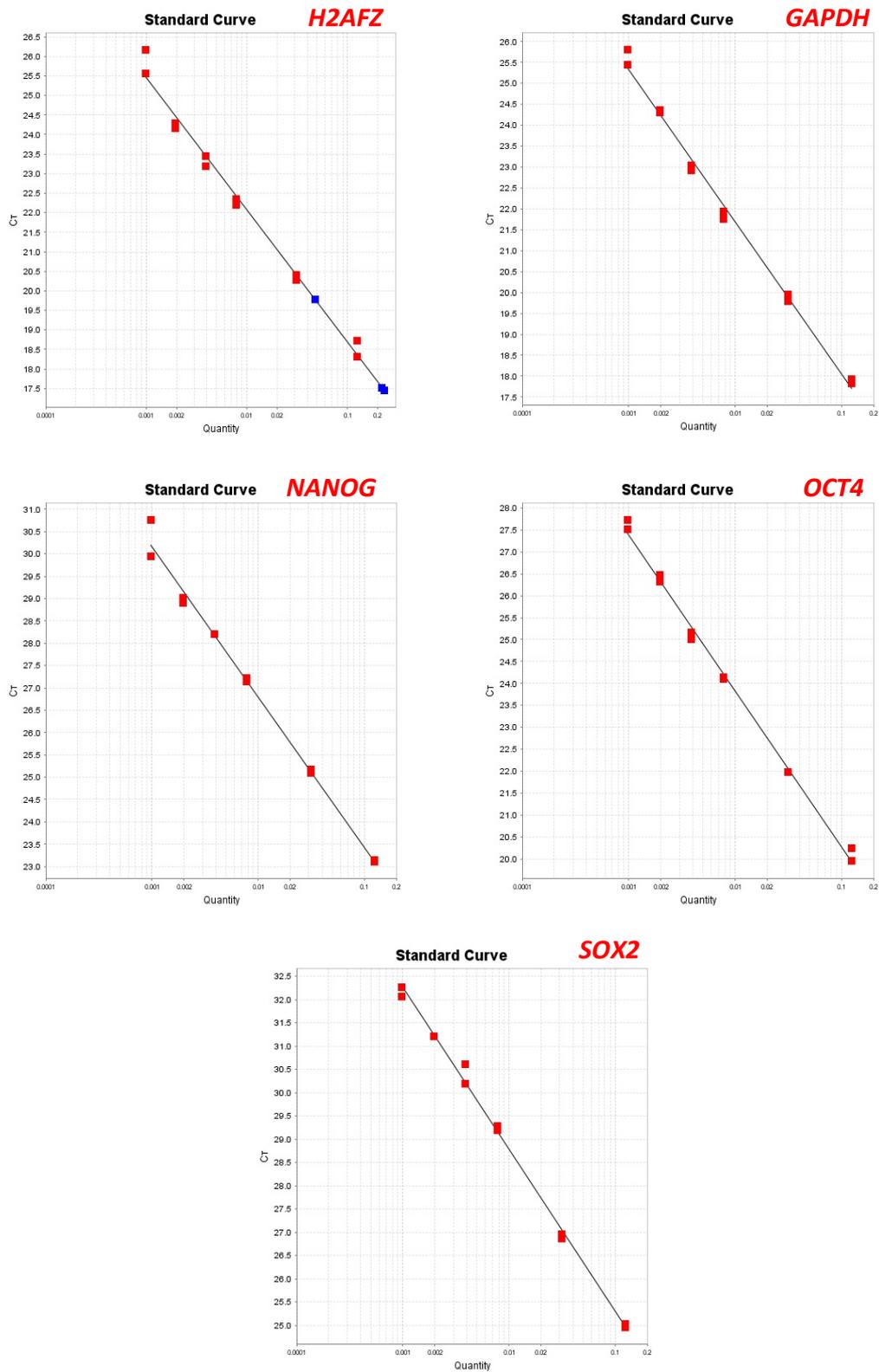


Figura 22. Rectas de eficiencia para los diferentes genes: H2AFZ, GAPDH, NANOG, OCT4 y SOX2.

### 3.3. Cuantificación relativa de la expresión génica de embriones vitrificados con diferentes medios y soportes.

El análisis de varianza de los datos normalizados no mostró diferencias significativas para la expresión diferencial de los genes *NANOG*, *OCT4* y *SOX2* de los embriones control y vitrificados con los medios y soportes que aparecen en la **Tabla 9** y en la **Figura 23**.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la cuantificación relativa de la expresión génica.

Medio vitrificación y soporte	<i>NANOG</i>	<i>OCT4</i>	<i>SOX2</i>	N
<b>Control</b>	1'082 ± 0'371	1'059 ± 0'185	0'687 ± 0'232	7
<b>18% dextrano y 0'3M sacarosa con straw y CryoTop</b>	1'444 ± 0'401	1'038 ± 0'200	0'256 ± 0'251	6
<b>10% dextrano y 0'3M sacarosa con CryoTop</b>	1'495 ± 0'401	1'119 ± 0'200	0'194 ± 0'251	6

Im±es: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar de los datos normalizados, solamente se aplicó transformación logarítmica en el caso de *SOX2*. N = número de muestras.

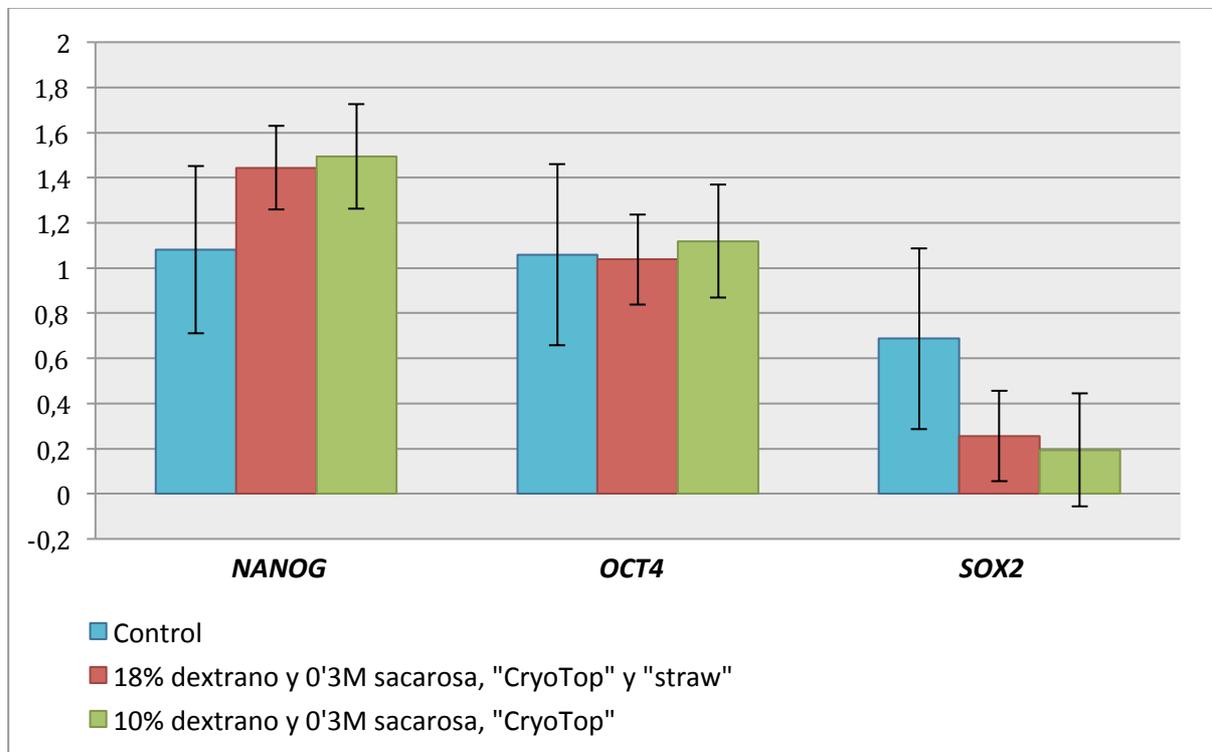


Figura 23. Niveles de expresión génica diferencial de los genes *NANOG*, *OCT4* y *SOX2* en embriones vitrificados con un medio 18% dextrano y sacarosa con los soportes de straw y CryoTop, y un medio 10% dextrano y sacarosa con CryoTop.

Los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* desempeñan un papel principal en el mantenimiento de la pluripotencia de las células embrionarias (Medvedev et al., 2008; Shi y Jin, 2010). Tanto *OCT4* como *NANOG* presentan la función de regular y dirigir la expresión de todos los genes implicados en el desarrollo embrionario. En concreto, *OCT4* es el transcrito más importante de la familia de factores de transcripción *POU*. Se ha observado su expresión en células embrionarias, células de la línea germinal y células madre, siendo esencial para el desarrollo embrionario preimplantacional (Yeom et al. 1996; Nichols et al., 1998). A su vez, *OCT4* es regulado por él mismo, por otros factores de transcripción como son *SOX2* y *NANOG*, y por mecanismos de regulación epigenéticos (Medvedev et al., 2008; Ben-Shusan et al., 1995; Shi y Wu, 2009).

En estudios realizados por Zhao et al. (2012) para evaluar los efectos de la vitrificación en blastocistos de ratón, se determinó una reducción significativa de los niveles de metilación de los promotores de los genes *OCT4* (85% vs 62'5%) y *NANOG* (77'5% vs 55%), lo que correlaciona con un aumento en la expresión de ambos genes en blastocistos vitrificados. Más tarde, en estudios llevados a cabo por Rajabpour-Niknam et al. (2013) se determinó un descenso de los niveles de expresión de *OCT4* en blastocistos de ratón vitrificados en estadio de 4-8 células, lo que puede afectar negativamente al desarrollo del embrión. Sin embargo, a pesar de emplear el mismo soporte, el *CryoTop*, en dicho estudio se empleó una solución de vitrificación combinando DMSO y EG lo que podría explicar las discrepancias con los resultados obtenidos en el presente estudio, también teniendo en cuenta que se trata de embriones de especies distintas.

En conejo, se han realizado estudios sobre la expresión de *OCT4* en embriones en estadio de mórula sin obtener diferencias significativas en cuanto a los niveles de metilación o la expresión de dicho gen (Saenz-de-Juano et al., 2014a).

De todos modos, el mejor criterio para valorar la calidad embrionaria es la transferencia de los embriones vitrificados, estudio que debería realizarse en un futuro para evaluar la viabilidad durante la gestación y el desarrollo postnatal. En trabajos realizados por Saenz-de-Juano et al. (2014b) se transfirieron embriones en estadio de mórula para evaluar los posibles efectos de la vitrificación sobre la expresión génica y como podría afectar a su desarrollo. En cuanto a los conejos nacidos, se determinó que la vitrificación produce una disminución del peso del feto y la placenta materna, a mitad de gestación. Sin embargo, se observó un aumento del peso de los recién nacidos. En cuanto a la expresión génica, no se detectaron diferencias significativas en embriones pre-implantacionales de día 6, aunque se observó que la vitrificación afecta a la expresión génica y proteica cuando se trata de embriones de día 14.

5

## Conclusiones

---

## 5. CONCLUSIONES

De los datos obtenidos a partir de este estudio se puede concluir que:

- El medio de EG con un 18% de dextrano y 0'3M de sacarosa permite el mejor desarrollo embrionario post-vitrificación.
- El soporte *CryoTop* proporciona con independencia del medio utilizado mejores resultados de desarrollo embrionario en comparación con el *straw*.
- Los blastocistos obtenidos post-vitrificación presentaron niveles de expresión génica de *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* similares a los controles.

6

## Referencias bibliográficas

---

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, J.; SHELTON, J.N. (1993) Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98: 459-465.
- BAUDOT, A.; ALGER, L.; BOUTRON, P. (2000) Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 40: 151-158.
- BEN-SHUSHAN, E.; SHARIR, H.; PIKARSKY, E.; BERGMAN, Y. (1995) A dynamic balance between ARP-I/COUP-TFL and retinoic acid receptor: retinoid X receptor heterodimers regulates OCT-3/4 expression in embryonal carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 25: 1034-1048.
- BOONKUSOL, D.; GAL, A.B.; BODO, S.; GORHONY, B.; KITIYANANT, Y.; DINNYES, A. (2006) Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 700-708.
- BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. (2004) Analysis of mRNA expression by Real-Time PCR, en: *Real-Time PCR: An Essential Guide*. K.J. Edwards et al., editors. Horizon Bioscience. Wymondham: 125-184.
- CAMUS, A.; CLAIRAZ, P.; ERSHAM, A.; VAN KAPPEL, A.L.; SAVIC, G.; STAUB, C. (2006) Principe de la vitrification: cinétiques comparatives. The comparison of the process of five different vitrification devices. *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*, 34: 737-745.
- CHEN, S.U.; LIEN, Y.R.; CHENG, Y.Y.; CHEN, H.F.; HO, H.N. & YANG, Y.S. (2001) Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction*, 16: 2350-2356.
- COUTINHO, A.R.S.; MENDES, C.M.; CAETANO, H.V.A.; NASCIMENTO, A.B.; OLIVEIRA, V.P.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; SINHORINI, I.L.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O. (2006) Morphological changes in mouse embryos cryopreserved by different techniques. *Microscopy Research and Technique*, 70: 296-301.
- DALCIN, L.; SILVA, R.C.; PAULINI, F.; SILVA, B.D.; NEVES, J.P.; LUCCI, C.M. (2013) Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*, 67: 137-145.
- DOBRINSKY, J.R. (1996) Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45: 17-26.
- EMILIANI, S.; VAN DEN BERGH, M.; VANNIN, A.S.; BIRAMANE, J.; ENGLERT, Y. (2000) Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Human Reproduction*, 15: 905-910.

## 6. Referencias bibliográficas

- ESAKI, R.; UEDA, H.; KUROME, M.; HIRAKAWA, K.; TOMII, R.; YOSHIOKA, H.; USHIJIMA, H.; KUWAYAMA, M.; NAGASHIMA, H. (2004) Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction*, 71: 432-437.
- FAHY, G. M.; RALL W. F. (2007). "Vitrification: an overview," en: *Vitrification in Assisted Reproduction*, M. J. Tucker and J. Liebermann, Eds., Informa Healthcare, London UK.
- FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.S.; MERYMAN, H.T. (1990) Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, 27: 247-268.
- FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. (1995) Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 32: 139-156.
- GAJDA, B. (1996) Vitrification of rabbit embryos at 1-cell to morula stage in an ethylene glycol-based solution. *Cryo-Letters*, 17: 363-370.
- GADJA B.; SMORAG Z. (2009) Oocyte and embryo cryopreservation - state of art and recent developments in domestic animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18: 371-387.
- HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. (1999) Minimum volumen cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology*, 51: 165 (abstract)
- HOCHI, S.; TERAOKA, T.; KAMEI, M.; KATO, M.; HIRABAYASHI, M.; HIRAO, M. (2004) Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volumen cooling procedure. *Theriogenology*, 61: 267-275.
- ISACHENKO, V.; FOLCH, J.; ISACHENKO, E.; NAWROTH, F.; KRIVOKHARCHENKO, A.; VAJTA, G.; DATTENA, M.; ALABART, J.L. (2003) Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology*, 60: 445-452.
- KASAI, M.; HAMAGUCHI, Y.; ZHU, S. E.; MIYAKE, T.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. (1992) High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biology of Reproduction*, 46: 1042-1046.
- KASAI, M.; KOMI, J. H.; TAKAKAMO, A.; TSUDERA, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. (1990) A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89: 91-97.
- KASAI, M. & MUKAIDA, T. (2004). Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 9: 164-170.
- KNOC, J.; KANYÓ, K.; KRISTON, R.; SOMOSKÓI, B.; CSEH S. (2014). Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *BioMed Research International*, 2014: 1-9.
- KULESHOVA, L.L.; SHAW, J.M.; TROUNSON, A.O. (2001) Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43: 21-31.

- KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. (2005) Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive Biomedicine Online*, 11: 608-614.
- LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K.; PHIL, D. (1999) Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, 72: 1073-1078.
- LEE, D.R.; YANG, Y.H.; EUM, J.H.; SEO, J.S.; KO, J.J.; CHUNG, H.M; YOON, T.K. (2007) Effect of using slush nitrogen (SN2) on development of microsurgically manipulated vitrified/warmed mouse embryos. *Human Reproduction*, 22: 2509-2514.
- LIEBERMANN, J.; DIETL, J.; VANDERZWALMEN, P.; TUCKER, M.J. (2003) Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reproductive Biomedicine Online*, 7(6): 623-633.
- LIEBERMANN, J; NAWROTH, F.; ISACHENKO, F.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M.J. (2002a). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of Reproduction*, 67: 1671–1680.
- LIEBERMANN, J.; TUCKER, M.; GRAHAM, J.; HAN, T.; DAVIS, A.; LEVY, M. (2002b) Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the felxipet denuding pipette. *Reproductive Biomedicine Online*, 4: 146-150.
- MAMO, S.; GAL, A.B.; POLGAR, Z.; DINNYES, A. (2008) Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5f1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology*, 9: 67.
- MASSIP A.; MERMILLOD P.; DINNYES A.; (1995). Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implication for their cryopreservation. *Human Reproduction*, 10: 3004-3011.
- MATORRAS, R.; HERNÁNDEZ, J.; eds (2007) *Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción*. Aldalia. Madrid. 659 pp.
- MAZUR, P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol., 247 (Cell. Physiol., 16): C125-C142*.
- MAZUR, P. (2010) A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. *Cryobiology*, 60: 4-10.
- MEDVEDEV, S.P.; SHEVCHENKO, A. I.; MAZUROK, N.A.; ZAKIAN, S.M. (2008) OCT4 and NANOG are the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. *Russian Journal of Genetics*, 44: 1377-1393.
- MERYMAN, H.T. (1966) Review of biological freezing, en: *Cryobiology*. Ed. H.T. Meryman. New York: 63.
- MIYAKE, T.; KASAI, M.; ZHU, S.E.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. (1993). Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology*, 40:121-134.

## 6. Referencias bibliográficas

- MOCHIDA, K.; HASEGAWA, A.; MING-WEN, L.; FRAY, M.D.; KITO, S.; VALLELUNGA, J.M.; LLOYD K.C.K.; YOSHIKI, A.; OBATA, Y.; OGURA, A. (2013) High osmolality vitrification: A new method for the simple and temperature-permissive cryopreservation of mouse embryos. *PLoS ONE*, 8: e49316.
- NAVARRETE-SANTOS, A.; TONAK, S.; KIRSTEIN, M.; KIETZ, S.; FISCHER, B. (2004) Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction research*, 128: 503-515.
- NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHÖLER, H.; SMITH A. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95: 379-391.
- O'KEARNEY-FLYNN, M.; WADE, M.; DUFFY, P.; GATH, V.; BOLAND, M. P.; DOBRINSKY, J. M. (1998) Effect of cryopreservation on IVP cattle embryos development in vitro and in vivo. *Theriogenology*, 49: 178 (Abstr.)
- ÖZKAVUKCU, S.; ERDEMLI, E. (2002) Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *J Ankara Medical School*, 24:187-196.
- POPELKOVÁ, M.; TURANOVÁ, Z.; KOPRDOVÁ, L.; OSTRÓ, A.; TOPORCEROVÁ, S.; MAKAREVICH, A.V.; CHRENEK, P. (2009) Effect of vitrification technique and assisted hatching on rabbit embryo developmental rate. *Zygote*, 17: 57-61.
- RAJABPOUR-NIKNAM, M.; TOTONCHI, M.; SHAHHOSSEINI, M.; FARROKHI, A.; ALIPOUR, H.; EFTEKHARI-YAZDI, P. (2013) Quantitative expression of developmental genes, Pou5f1 (Oct4) and Mest (Peg1), in vitrified mouse embryos. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11: 733-740.
- RALL, W.F.; FAHY, G. M. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.
- RALL, W.F.; MAZUR, P.; McGRATH, J. J. (1983) Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. *Biophys. J.*, 41: 1-12.
- RENARD, J.P. (1985) La conservation de l'embryon de mammifere. Tesis Doctoral. Université Pierre et Marie Curie.
- RI-CHENG, C. (2010). Cryobiology: an overview, en: *Fertility Cryopreservation*. Ed. Cambridge University Press. Cambridge, 1-9.
- SAENZ-DE-JUANO, M.D.; PEÑARANDA, D.S.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J.S. (2014a) Does vitrification alter the methylation pattern of OCT4 promoter in rabbit late blastocyst? *Cryobiology* (doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.06.002)
- SAENZ-DE-JUANO, M.D.; MARCO-JIMENEZ, F.; SCHMALTZ-PANNEAU, B.; JIMENEZ-TRIGOS, E.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; PEÑARANDA, D.S.; JOUNEAU, L.; LECARDONNEL, J.; LAVARA, R.; NATURIL-ALFONSO, C.; DURANTHON, V.; VICENTE, J.S. (2014) Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. *Reproduction*, 147: 1-14.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. (2011) Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141: 1-19.

## 6. Referencias bibliográficas

- SHAW, J.M.; KOLA, I.; MCFARLANE, D.R.; TROUNSON, A.O. (1991) An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J. Reprod. Fert.*, 91: 9-18.
- SHAW, J.M.; KULESHOVA, L.L.; MACFARLANE, D.R.; TROUNSON A.O. (1997) Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, ficoll, or dextran. *Cryobiology*, 35: 219-229.
- SHI, G.; JIN, Y. (2010) Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy*, 1: 39.
- SHI, W.; XUE, X.; ZHANG, S.; ZHAO, W.; LIU, S.; ZHOU, H.; WANG, M.; SHI, J. (2012) Perinatal and neonatal outcomes of 494 babies delivered from 972 vitrified embryo transfers. *Fertility and Sterility*, 97: 1338-1342.
- SHI, L.; WU, J. (2009) Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7: 59-70.
- SMORAG, Z.; GAJDA B.; WIECZOREK B.; JURA J. (1989) Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31: 1227-1231.
- STEPONKUS, P.L.; MYERS, S.P.; LYNCH, D.V.; GARDNER, L.; BRONSHTEYN, V.; LEIBO, S.P.; RALL, W.F.; PITT, R.E.; LIN, T.T.; MACINTYRE, R.J. (1990) Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, 345: 170-172.
- USHIJIMA, H.; YOSHIOKA, H.; ESAKI, R.; TAKAHASHI, K.; KUWAYAMA, M.; NAKANE, T.; NAGASHIMA H. (2004) Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 50: 481-486.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. (1997) Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 38: 349-352.
- VAN BLERKOM, J. (1989) Maturation at high frequency of germinal-vesicle-stage mouse oocytes after cryopreservation: alterations in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. *Human Reproduction*, 4: 883-898.
- VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C.; STANDAART, V.; SCHOYSMAN, E. (2000) "In vitro" survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Fertility and Sterility*, 74: S215-S216 (abstract).
- VICENT, C.; JOHNSON, M.H. (1992) Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford reviews of reproductive biology*, 14: 73-100.
- VICENTE, J.S.; GARCÍA-XIMENEZ, P. (1994) Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenology*, 42: 1205-1215.
- VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; MARCO, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2011) Detrimental effect on availability of buserelin acetate administrated in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76: 1120-1125.

## 6. Referencias bibliográficas

- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; CORTELL, C.; VICENTE, J.S. (2010) Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. *Theriogenology*, 74: 1623-1628.
- WANG, S.; TANG, X.; NIU, Y.; CHEN, H.; LI, B.; ZHANG, X.; HU, Z.; ZHOU, Q.; JI, W. (2007) Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25: 481-489.
- WATSON, P. F.; MORRIS, G. J. (1987) Cold shock injury in animal cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 41: 311-340.
- WELTZIEN, F.A.; PASQUALINIB, C.; VERNIERB, P.; DUFOURA, S. (2005) A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *General and Comparative Endocrinology*, 142: 134-142.
- YAVIN, S.; ARAV, A. (2001) Development of immature bovine oocytes vitrified by minimum drop size technique and a new vitrification apparatus (VIT-MASTER). *Cryobiology*, 43: 331 (abstract).
- YEOM, I.; FUHRMANN, G.; OVITT, C.E.; BREHM, A.; OHBO, K.; GROSS, M.; HUBNER, K.; SCHÖLER, H.R. (1996) Germline regulatory element of OCT4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 122: 881-894
- ZHAO, X.M.; DU, W.H.; HAO, H.S.; WANG, D.; QIN, T.; LIU, Y.; ZHU, H.B. (2012) Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, 79: 445-450. **G**