

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



Aplicación de Corifolitropina alfa en la producción de embriones en conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: LYDIA FORTEA GONZÁLEZ

TUTOR: JOSÉ SALVADOR VICENTE ANTÓN

Curso Académico: 2016/2017

VALENCIA, FEBRERO 2017



TÍTULO

Aplicación de Corifolitropina alfa en la producción de embriones de conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

RESUMEN

En los últimos años, los tratamientos de superovulación, inseminación artificial, producción de embriones y su crioconservación, han constituido las herramientas biotecnológicas más utilizadas tanto en reproducción humana asistida como en mejora genética de especies ganaderas, como el conejo. En reproducción animal, las técnicas de superovulación permiten incrementar el número de óvulos y embriones obtenidos por hembra, reduciendo así los costes y facilitando el desarrollo de nuevas técnicas reproductivas y genéticas. Como contrapartida, estos tratamientos pueden producir gran variabilidad en la respuesta, así como afectar a la calidad de los embriones. Asimismo, al combinar estas técnicas con protocolos de crioconservación, como la congelación o vitrificación, se puede observar una reducción significativa del desarrollo embrionario debido a la mayor susceptibilidad de los embriones superovulados a resultar dañados debido a bajas temperaturas.

El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación del efecto del tratamiento de larga duración FSH-CTP, y de forma repetida, sobre la estimulación ovárica y recuperación embrionaria de dos grupos experimentales de conejas, múltiparas y nulíparas. Adicionalmente, se procedió a la investigación del efecto de este tratamiento en combinación con técnicas de vitrificación, mediante el estudio de la viabilidad de los embriones recuperados con los métodos de cultivo *in vitro* y transferencia embrionaria.

Los resultados obtenidos mostraron una respuesta favorable al tratamiento por parte de ambos grupos experimentales, aunque fueron las hembras nulíparas las que obtuvieron mejores resultados en términos de tasa de ovulación. En este estudio, la repetición del tratamiento no causó ningún efecto significativo en la respuesta. Las hembras nulíparas superovuladas también generaron mayor cantidad de embriones que consiguieron expandirse en el cultivo; aunque no mostraron diferencias significativas en cuanto a las transferencias embrionarias. Por otra parte, los embriones que habían sido vitrificados generaron una tasa menor de nacidos vivos que aquellos que no habían sido crioconservados.

PALABRAS CLAVE

Superovulación; crioconservación; vitrificación; coneja; embriones; FSH-CTP; desarrollo embrionario

DATOS DEL TRABAJO

Alumna: Dña. Lydia Fortea González

Tutor Académico: Prof. D. José Salvador Vicente Antón

Valencia, Febrero 2016

TITLE

Application of the Corifolitropin alfa in the embryo production of rabbit (*Orycolagus cuniculus*)

ABSTRACT

In the last years, superovulation treatments, artificial inseminations, productions of embryos and their cryopreservation have become in Biotechnological tools commonly used in both assisted human reproduction and genetic improvement for livestock species, like rabbits. On the one hand, superovulation techniques have allowed to increase the number of ovules and embryos per doe, thus reducing the costs and facilitating the development of new reproductive and genetic techniques. Nevertheless, those techniques have several limitations like a high variability in response and the reduction of the embryos quality. On the other hand, the combination of those techniques with cryopreservation protocols like frozen and vitrification, can affect considerably to embryo development, due to the greater susceptibility of superovulated embryos to get injured because of low temperatures.

The aim of this project was the evaluation of the effect of the long-term repeated treatment FSH-CTP on the ovarian stimulation and embryos recuperation of both groups, multiparous and nulliparous. Furthermore, the evaluation of the recovered embryo viability subjected to vitrification protocols was done with both methods *in vitro* culture and embryo transfers.

The results showed that both does experimental groups had obtained a favorable response to the superovulation treatment, although the nulliparous ones generated a better results according to the ovulation rate. The repetition of the treatment had not significant effect. Those embryos which derived from nulliparous does shown high development rates to hatched blastocystes, at *in vitro* culture than multiparous embryos; although no effect on survival rate at birth post-transfer was observed. In addition, vitrified embryos generates less survival rates than those which were not cryopreservated.

KEY WORD

Superovulation; cryopreservation; vitrification; rabbit; embryos; FSH-CTP; embryo development

PROJECT DATA

Student: Ms. Lydia Fortea González

Academic tutor: Prof. D. José Salvador Vicente Antón

Valencia, February 2016

AGRADECIMIENTOS

Este apartado resulta un tanto difícil de resumir ya que han sido tantas las personas que me han ayudado durante mis años en la universidad que no me es posible citarlas a todas. Durante mi época como estudiante de Biotecnología, ha habido momentos muy duros, largas jornadas de estudio, inseguridades, presiones, etc. pero siempre he sabido superarlos gracias a todas aquellas personas que han permanecido a mi lado y me han dado todo su apoyo. Tampoco han sido todo malas épocas, también ha habido muchos momentos de alegría y felicidad, como cuando apruebas un examen o te reencuentras con tus amigos un año más.

Todas aquellas personas saben que les estaré eternamente agradecida, pero merece la pena destacar de entre todas a mis padres, aquellos que me han permitido llegar hasta donde estoy, nunca han dudado de mi capacidad y me han estado apoyando durante ya 22 largos años. Os quiero mucho, gracias a vosotros soy como soy.

También, quería dar las gracias a Jose S. Vicente, mi tutor, por la oportunidad que me ha concedido al permitirme realizar mi Trabajo Fin de Grado en su laboratorio. Gracias por todo lo que me has enseñado durante la carrera y el TFG y por lo que me has ayudado en estos meses. En el pasado me pareciste un muy buen profesor, pero estos meses me han confirmado que eres también un gran tutor y una persona extraordinaria.

Por supuesto, gracias también a todas las personas del laboratorio por ayudarme en todo lo posible. Paco, Luis, Ximo, Alba, muchas gracias por ayudarme en mi trabajo siempre que lo he necesitado y por todos los consejos que me habéis dado. Sois todos unas grandes personas, que me habéis hecho sentir como una más de vuestra familia por lo que estoy muy agradecida.

Gracias a ti, Fran, por todos los momentos que has estado a mi lado, apoyándome, sacándome una sonrisa en cada momento en que lo he necesitado. Estoy segura de que sin ti no habría llegado donde estoy, o por lo menos no de la misma forma. Te quiero mucho, grandullón.

Y cómo olvidarme del Gali, aquella residencia donde comencé mi aventura como universitaria, donde he vivido con tantas y tan buenas personas, que se han convertido en una parte esencial de mi vida. Gracias a todos, y en especial a nuestro grupo Biotec-Gali, porque el haber estado estudiando y conviviendo juntas nos ha permitido vivir momentos únicos e inigualables.

Gracias también a todos los amigos y compañeros de clase con los que he compartido tantos momentos. A todos aquellos profesores que han ayudado a fomentar nuestro conocimiento así como a amar lo que hacemos. Estos años no hubieran sido lo mismo sin vosotros.

Gracias a todos por ayudarme a cumplir mis sueños. Al fin puedo decir que soy graduada en Biotecnología.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos básicos de la ovulación en coneja	2
1.2 Tratamientos de superovulación en coneja	4
1.3 Crioconservación embrionaria en conejo	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Diseño experimental	14
3.2 Animales	15
3.3 Recuperación de embriones	15
3.3.1 Tratamiento de superovulación	15
3.3.2 Inseminación artificial y Evaluación del semen	16
3.3.3 Recuperación de embriones <i>in vivo</i> y <i>post-mortem</i>	17
3.4 Procesos de vitrificación y des-vitrificación	19
3.5 Viabilidad embrionaria <i>in vitro</i>. Cultivo de embriones	19
3.6 Viabilidad embrionaria <i>in vivo</i>. Transferencia de embriones	20
3.7 Análisis estadístico	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Efectos de la estimulación ovárica sobre la tasa de ovulación y la recuperación de embriones	22
4.2 Efectos de las técnicas de superovulación y crioconservación sobre el desarrollo <i>in vitro</i>	24
4.3 Efectos de las técnicas de superovulación y crioconservación sobre el desarrollo <i>in vivo</i>	28
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en coneja	3
Figura 2.	Representación del crecimiento del ovocito, captación y maduración durante la foliculogénesis. Adaptado de Mermillod et al. (1999)	4
Figura 3.	Diseño experimental	14
Figura 4.	Conejo de origen neozelandés Blanco (New Zealand White)	15
Figura 5.	Imagen resultante del ISAS de una muestra heterospérmica utilizada en la inseminación de las conejas superovuladas.....	16
Figura 6.	Colocación de la coneja en posición decúbito supino para la laparoscopia.....	17
Figura 7.	Embriones recuperados observados bajo lupa binocular	18
Figura 8.	Ovario superovulado con folículos con cicatrices de ovulación	19
Figura 9.	Desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	20
Figura 10.	Ovario superovulado no inducido carente de cicatrices de ovulación	22
Figura 11.	Tasa de ovulación obtenida para los factores estadio fisiológico (Multipara, Nulíparas) y sesión de tratamiento (1º y 2º)	23
Figura 12.	Tasa de desarrollo embrionario <i>in vitro</i> hasta blastocisto y blastocisto expandido obtenida para los factores procedencia del embrión (multíparas y nulíparas) y tipo de embrión (control y vitrificado)	25
Figura 13.	Tasa de desarrollo embrionario hasta blastocisto expandido obtenida por la interacción de los factores procedencia (multíparas y nulíparas) y tipo de embrión (control y vitrificado)	27
Figura 14.	Tendencia de desarrollo de la interacción entre el origen (multíparas y nulíparas) y el estado (vitrificado y control) de los embriones	27
Figura 15.	Tasa de supervivencia de embriones en transferencias <i>in vivo</i> para los factores de origen (multíparas y nulíparas) y tipo de embrión (vitrificado y control)	29
Tabla 1.	Protocolos de superovulación con eCG empleados en coneja	6
Tabla 2.	Protocolos de superovulación con FSH empleados en coneja	7
Tabla 3.	Efecto del tratamiento de superovulación repetido sobre la tasa de ovulación y la recuperación de embriones	23
Tabla 4.	Efecto del origen y estado del embrión sobre la tasa de desarrollo en cultivo <i>in vitro</i>	25
Tabla 5.	Resultados de la interacción de los factores origen y tipo de embrión en la tasa de desarrollo <i>in vitro</i> hasta el estadio de blastocisto expandido....	26
Tabla 6.	Efecto del origen y estado del embrión sobre la tasa de supervivencia en transferencias <i>in vivo</i>	28

ABREVIATURAS

BMP-15: proteína morfogenética ósea 15
BSA: bovine serum albumine (albúmina sérica bovina)
CHO: Chinese hamster ovary (ovario de hámster chino)
CIV: cultivo in vitro
COC: complejo cúmulo-ovocito
CTP: péptido carboxilo-terminal
DMSO: dimetilsulfóxido
DPBS: Dulbecco's phosphate buffer saline (tampón fosfato salino de Dulbecco)
EFS: sacarosa
EG: etilenglicol
eCG: gonadotropina coriónica equina
FBS: fetal bovine serum (suero fetal bovino)
FSH: hormona folículo-estimulante
FSH-CTP: corifolitropina alfa
FSHR: receptor de la hormona folículo-estimulante
GDF9: factor de crecimiento/diferenciación 9
GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas
hCG: gonadotropina coriónica humana
IA: inseminación artificial
IM: vía intramuscular
IO: inducción de la ovulación
IV: vía intravenosa
LH: hormona luteinizante
LHR: receptor de la hormona luteinizante
ML: multíparas
NL: nulíparas
oFSH: hormona folículo-estimulante de origen ovino
pFSH: gonadotropina hipofisaria de origen porcino
pLH: hormona luteinizante de origen porcino
PROH: propanodiol
PVP: polivinilpirrolidona
rhFSH-CTP: proteína quimérica recombinante humana
rhFSH: hormona folículo-estimulante recombinante humana
rhLH: hormona luteinizante recombinante humana
SC: vía subcutánea
T.O: tasa de ovulación
T.R: tasa de recuperación
uFSH: hormona folículo-estimulante humana urinaria
UI: unidades internacionales

1 INTRODUCCIÓN

- 1.1 Aspectos básicos de la ovulación en coneja.**
- 1.2 Tratamientos de superovulación en coneja.**
- 1.3 Crioconservación embrionaria de conejo.**

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología reproductiva comprende una amplia gama de técnicas que permiten aumentar la eficiencia de la reproducción tanto en animales como en el ser humano (Palma, 2008). De entre estas tecnologías, es posible destacar las técnicas de estimulación ovárica, la maduración de óvulos, la fecundación *in vitro*, el cultivo de embriones o la criopreservación de gametos y embriones, entre otras (Cortell, 2012).

Las técnicas de estimulación ovárica se basan en la estimulación de los ovarios de la hembra mediante el uso de hormonas exógenas, de esta forma se provoca un aumento en el número de óvulos y embriones por ciclo, incrementando así las posibilidades de obtención de descendencia (Cortell, 2012). Los tratamientos de superovulación se han empleado tanto en producción animal como en la reproducción humana asistida y, en general, estos tratamientos combinados con la inseminación artificial (IA) o la microinseminación ha permitido incrementar la eficiencia reproductiva. Mientras que en la práctica clínica se ha conseguido resolver problemas de fertilidad, en producción animal se ha facilitado la difusión y conservación de recursos genéticos animales (Guzick *et al.*, 1999; Kavoussi, 2013). Por otra parte, la obtención de un elevado número de óvulos y embriones facilita la puesta a punto y/o el desarrollo de otras herramientas reproductivas y genéticas como la crioconservación, la producción embrionaria *in vivo*, la clonación o la transgénesis (Besenfelder *et al.*, 2002; Cortell, 2012).

De todas formas, los tratamientos de superovulación presentan como limitaciones la variabilidad en la respuesta y las alteraciones en la calidad de óvulos y embriones, las cuales han promovido la realización tanto de estudios sobre la foliculogénesis y ovogénesis, como el desarrollo de nuevos productos y modos de administración de los tratamientos que reduzcan los efectos no deseados (Herreros, 2014).

El conejo, por su parte, es una de las pocas especies utilizadas tanto como modelo biomédico, como especie de producción ganadera (Cortell, 2012). Respecto al ámbito biomédico, el conejo es comúnmente utilizado en biotecnología de la reproducción y de la embriología, principalmente por dos motivos; por un lado, su desarrollo embrionario es similar al de la especie humana, lo que permite estudiar el impacto que puedan tener las alteraciones durante las primeras etapas de la gestación; por otro lado, existe un amplio conocimiento molecular y morfológico de las etapas de gastrulación, implantación y placentación en esta especie, las cuales también recuerdan en sus etapas iniciales a las del ser humano (Fischer *et al.*, 2012). Como especie de producción ganadera, cabe destacar su elevada tasa reproductiva, su alimentación no competitiva con la humana y su eficiencia de conversión, lo que permite obtener proteínas a un coste relativamente bajo. En ambos campos de trabajo, resulta una ventaja el uso del conejo como modelo experimental debido a que la obtención de esperma y embriones, su crioconservación, cultivo *in vitro*, inseminación artificial y transferencia embrionaria están bien establecidas.

1.1 Aspectos básicos de la ovulación de la coneja

Antes de proceder con cualquier tratamiento de superovulación, es fundamental conocer el funcionamiento general de la ovulación y los elementos que regulan la dinámica folicular y la adquisición de la competencia del óvulo en conejas, las cuales presentan varias diferencias con respecto a otras especies de mamíferos. Entre sus peculiaridades reproductivas, cabe destacar el hecho de que esta especie no presenta un ciclo sexual como resultado estrictamente del desarrollo folicular y luteal, sino que es considerada como ovuladora inducida por el coito (Bakker and Baum, 2000; Cortell, 2012). Esta característica permite obtener una cronología más precisa sobre los procesos de ovulación y desarrollo embrionario, facilitando así el estudio de los factores nutricionales, ambientales o farmacológicos sobre las primeras etapas reproductivas (Hoffman *et al.*, 1998; Tao and Niemann, 2000; Lee and DeMayo, 2004). Respecto a la anatomía, las conejas presentan un par de cuernos uterino separados a nivel del cérvix. Gracias a esta característica se pueden realizar estudios sobre el tratamiento o procesado previo de los embriones y seguir indistintamente su desarrollo en el mismo ambiente uterino (Fisher *et al.*, 2012).

Las conejas alcanzan su madurez sexual a los 4-5 meses de vida. Además, éstas pueden estar simultáneamente gestantes y amamantando a la camada del último parto. Las conejas muestran un celo en un intervalo de 4-6 días, el comportamiento sexual receptivo es consecuencia del 17β -estradiol (Rodríguez y Ubilla, 1998; Theau-Clément *et al.*, 2005) el cual actúa a nivel del eje hipotálamo-hipofisario (Bakker and Baum, 2000). En este estado, las hembras presentan diferentes señales indicadoras como una lordosis ante la presencia del macho (Theau-Clément *et al.*, 2005) o una vulva de color rojo (Rodríguez and Ubilla, 1998). Cuando los folículos degeneran, la secreción de estrógeno disminuye y las hembras entran en un breve periodo no receptivo (Harcourt-Brown, 2002).

Se debe señalar que, si tras la ovulación la hembra no queda gestante, entra en un periodo denominado de pseudogestación que conlleva una fase luteal de unos 14 días, tras la cual nuevos folículos alcanzan un nivel de desarrollo suficiente para poder ser inducidos a ovular. Este proceso determina un ciclo sexual aproximado de 17 días (Browning *et al.*, 1980).

Como en otras especies, el eje hipotálamo-hipofisario es el encargado de regular el comportamiento sexual y la reproducción (Pawson y McNeilly, 2005), teniendo en cuenta que en la coneja es el estímulo coital el que desencadena finalmente la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo. La GnRH, por su parte, es la encargada de regular la liberación de gonadotropinas por parte de la hipófisis, la cual segrega la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que son dos gonadotropinas que actúan a nivel del folículo ovárico. En la Figura 1, se representa un esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisis-ovario en conejo.

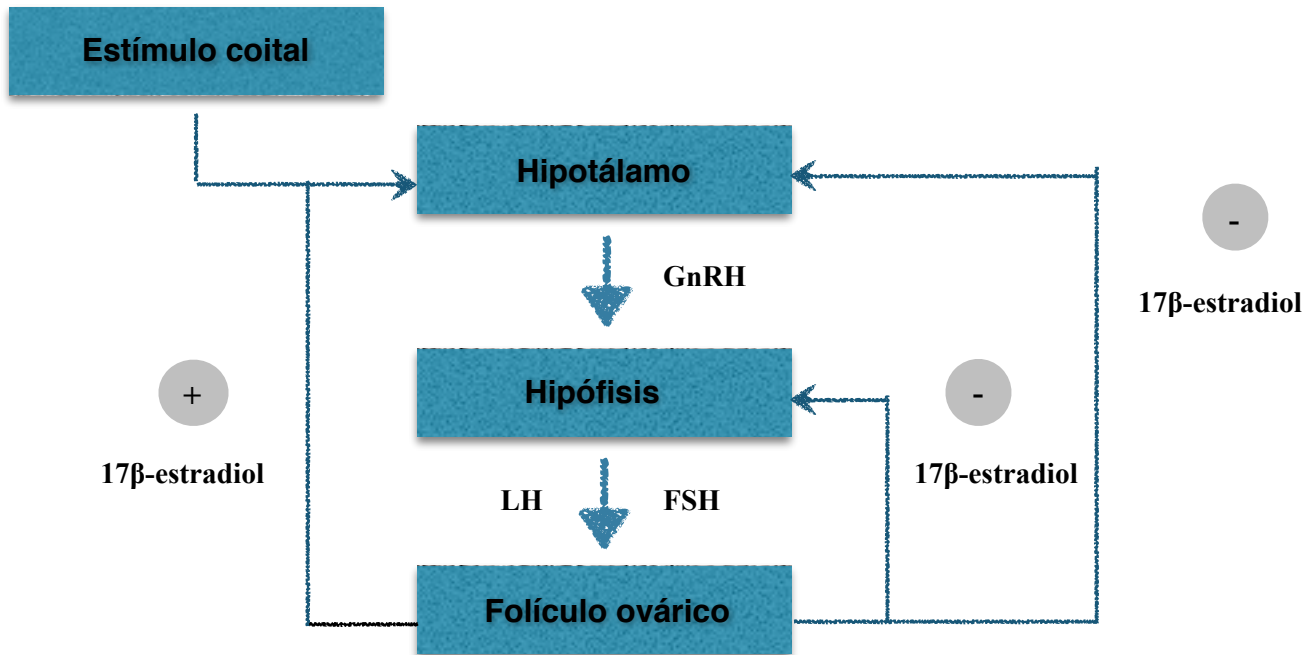


Figura 1. Esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en coneja.

Para entender la maduración ovocitaria, es necesario hacer referencia al folículo, la unidad funcional del ovario (Mehlmann, 2005). Los folículos se forman durante el desarrollo embrionario del individuo y están compuestos por una o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito (Gougeon, 1996; Zeleznik, 2004). En las hembras, las oogonias fetales entran en meiosis y se detienen en el estado de diplotente de la profase I, de esta forma se constituye una reserva de folículos primordiales, de los cuales solamente algunos alcanzan el estado preovulatorio o de Graaf en la etapa adulta, y, solo después de la ovulación y fecundación, acabarán el proceso de meiosis (Mehlmann, 2005). El crecimiento de los folículos primordiales, primarios y secundarios no dependen de las secreciones de gonadotropinas hipotálamo-hipofisarias sino de factores intrafoliculares como GDF9, BMPs y otros factores de crecimiento (Sánchez *et al.*, 2009). Tan solo los folículos que inician la formación del antro tendrán capacidad de responder a la FSH, lo que facilitará el desarrollo y la maduración del ovocito y, de esta forma, la adquisición de receptores para la LH. Finalmente, sólo unos pocos de los folículos reclutados emergerán, pasándose a denominar folículos dominantes (Mehlmann, 2005; Sirard *et al.*, 2006), mientras que el resto sufrirán un proceso de atresia (Tilly *et al.*, 1991). Durante esta etapa, se va formando el antro y las células de la granulosa pasan a diferenciarse en células del cúmulo, íntimamente ligadas al ovocito (Gilchrist *et al.*, 2008), dando lugar a una estructura conocida como complejo cúmulo-ovocito (COC) (Albertini *et al.*, 2001). Esta estrecha relación permite la regulación de la ovogénesis, en la que participan tanto las células del cúmulo como el ovocito mediante la secreción de diversos factores en sentido bidireccional (Gilchrist *et al.*, 2008). En la Figura 2, se puede observar un esquema del desarrollo folicular y ovocitario hasta la ovulación.

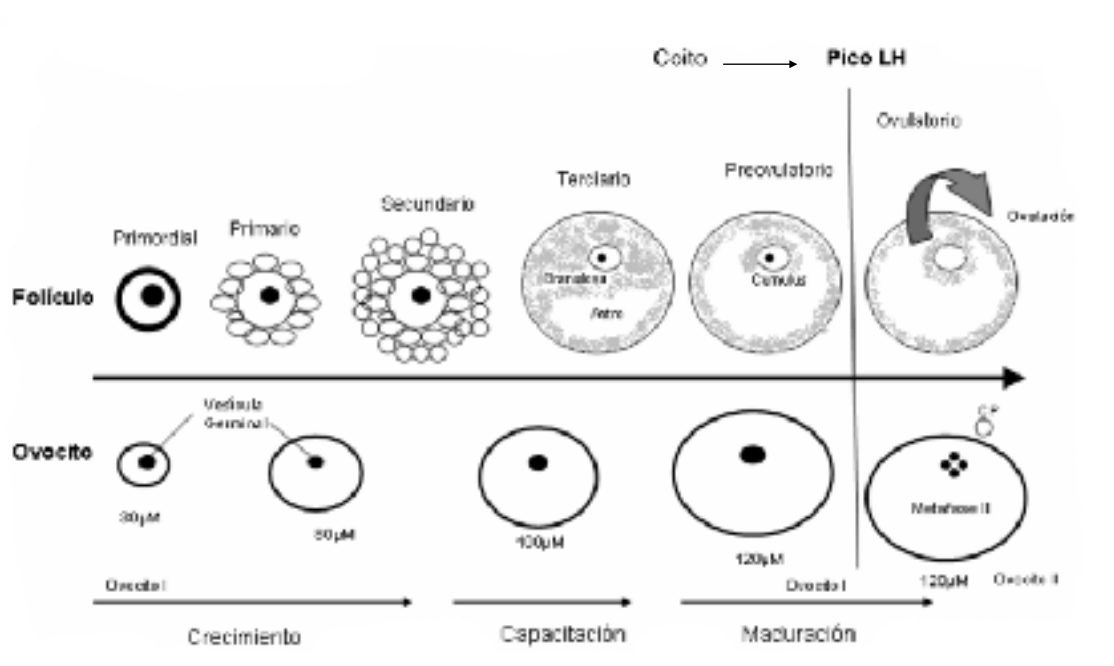


Figura 2. Representación del crecimiento del ovocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis. Adaptado de Mermillod *et al.*, 1999.

El coito en la coneja desencadena un pico preovulatorio de LH, provocando la disrupción de las uniones GAP entre las células del cúmulo y el ovocito (Tosti, 2006), lo que permite la reanudación de la meiosis del ovocito hasta el estadio de metafase II (Sirard *et al.*, 2006). Para finalizar la meiosis será necesaria la fecundación del mismo (Chen *et al.*, 2003), ya que el espermatozoide activa al óvulo incrementando los niveles de Ca^{2+} que degradan los compuestos inhibitorios de la meiosis (Jones, 2005).

En conclusión, se puede decir que existen tres niveles de regulación del desarrollo y selección de los folículos ovulatorios:

1. Los factores intrafoliculares que aumentan o disminuyen la acción gonadotrópica.
2. Las gonadotropinas circulantes (FSH y LH)
3. Los factores producidos por los folículos dominantes que inhiben el desarrollo de otros folículos mediante los mecanismos gonadotrópico-dependientes.

1.2 Tratamientos de superovulación en conejas

Como se ha mencionado anteriormente, la estimulación ovárica se basa en la administración de una gonadotropina exógena, la cual imita el efecto de la FSH endógena cerca del final de la fase luteal y durante la fase folicular del ciclo para aumentar el número de óvulos o embriones que se obtienen (Herrerros, 2014). Como contrapartida, estos tratamientos pueden suponer una disminución de la calidad de los ovocitos y embriones, debido al aumento de los fallos de ovulación, el número de folículos hemorrágicos o la tasa de gametos no fecundados (Fujimoto *et al.*, 1974; Chrenek *et al.*, 1998; Kauffman *et al.*, 1998; Leoni *et al.*, 2001; Mehainsen *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2007). Asimismo, la repetición de los tratamientos de superovulación en una misma hembra, empleando una misma hormona pueden desencadenar una respuesta humoral que dé lugar a la producción

de anticuerpos anti-gonadotropinas y por ende, afectar a la respuesta del tratamiento (Swanson *et al.*, 1996; Mehainsen *et al.*, 2006; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009).

La respuesta a los tratamientos de estimulación ovárica depende de factores ligados al momento del ciclo sexual, nutricionales, ambientales, a la línea, estirpe o raza, y también al tipo de hormona empleada y al protocolo de administración (Squires y McCue, 2007). Todos estos factores provocan una elevada variabilidad de la respuesta en términos de número de óvulos y embriones, y en su calidad. De esta forma, el tratamiento de superovulación va a depender de la concentración de gonadotropinas empleadas y de un complejo sistema de señales paracrinas y autocrinas de los factores producidos por los propios folículos, los cuales pueden aumentar o reducir la respuesta al tratamiento.

Por lo general, los objetivos y los tratamientos de superovulación empleados en la práctica clínica difieren de los realizados en producción animal. En la parte clínica se utilizan dos productos para tratar problemas de infertilidad en la mujer: la hormona folículo-estimulante humana urinaria (uFSH) y la hormona folículo-estimulante recombinante humana (rhFSH) (Palma, 2008). Actualmente, el uso de gonadotropinas recombinantes (rhFSH) se ha impuesto en el mercado debido a que los tratamientos con uFSH, al proceder de mujeres donantes, pueden contener restos de medicamentos, virus e incluso priones que pueden afectar a la paciente (Out, 2005). Como ventaja de la uFSH, se debe destacar su mejor relación coste-beneficio (Hatoum *et al.*, 2005).

En producción animal, el principal interés de la superovulación es incrementar la tasa de descendencia de la hembra. Principalmente, se han empleado dos tipos de gonadotropinas con diferente origen biológico: coriónicas (gonadotropina coriónica equina, eCG) e hipofisarias (FSH de origen porcino, pFSH; ovino, oFSH; equino, eFSH o recombinante, rhFSH), con cierto debate sobre que tratamiento consigue una mejor respuesta superovulatoria (Pliego, 2005; Mehainsen *et al.*, 2005). En conejo, algunos estudios observaron mejores resultados al estimular a las hembras con FSH (Kenelly y Foote, 1965; Maurer *et al.*, 1968; Joly, 1997; Rebollar *et al.*, 2000), mientras que otros observaron mayores respuestas en los tratamientos con eCG (Besenfelder, 1991; Kauffman *et al.*, 1998).

Hay que tener en cuenta el protocolo de administración más adecuado se va a definir en función del tipo de hormona empleada, en referencia a su vida media y su eliminación renal (Rose *et al.*, 2000). Las tres hormonas utilizadas en este tipo de tratamiento (eCG, FSH y LH) son glicoproteínas cuya vida media en circulación se determina según su peso molecular, el ácido siálico terminal y los grupos sulfatos que contienen (Morell *et al.*, 1971). La eCG se produce en las células trofoblásticas endometriales de la yegua y contiene un elevado nivel de ácido siálico lo que provoca una larga permanencia en la sangre (Maertens y Luzi, 1995), permitiendo su administración en una única dosis y minimizando así la manipulación de los animales. Por el contrario, la FSH y LH contienen una menor cantidad de ácido siálico por lo que presentan una corta vida media (Rose *et al.*, 2000) y su protocolo de administración implica el suministro de dosis cada 12 horas durante 3 o 4 días (Kenelly y Foote, 1965; Joly, 1997; Kauffman *et al.*, 1998; Besenfelder *et al.*, 2002; Salvetti *et al.*, 2007).

En coneja, como ya hemos comentado, se han usado ambas gonadotropinas, eCG y FSH derivados de la pituitaria, para inducir la estimulación ovárica (Kanayama *et al.*, 1994; Kauffman *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2004; Mehainsen *et al.*, 2005; Mehainsen *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007). Sin embargo, más recientemente, se han empezado a utilizar la LH y FSH recombinantes humanas (Viudes-de-Castro *et al.*, 2009 y 2015; Cortell *et al.*, 2010) debido a que la eCG, a pesar de su larga vida media en el plasma, ha demostrado afectar

negativamente al desarrollo del embrión (Taneja *et al.*, 1990). A pesar de que varios estudios han constatado que el uso de FSH frente a eCG presenta varias ventajas, su corta vida media en circulación, requiere un protocolo de administración de dos veces al día durante 3-4 días para estimular el crecimiento folicular, lo que equivaldría a una simple inyección de eCG (Renard *et al.*, 1982; Joly, 1997; Kauffman *et al.*, 1998). Esta limitación ha promovido el estudio de diferentes procedimientos para aumentar la vida media de la FSH, que se comentarán posteriormente.

Las tablas 1 y 2 muestran diferentes protocolos de superovulación en coneja empleando eCG y FSH, y los principales resultados obtenidos.

Tabla 1. Protocolos de superovulación con eCG empleados en coneja.

	REFERENCIA	DOSIS	IO	TO	RE	RO
eCG	Kennelly y Foote, 1965	6 x 12.5 UI	2.5 mg LH	16.6	-	13.7
	García-Ximenez y Vicente, 1990	50 UI	-	19.7	17.9	-
	López-Bejar and López-Gatius, 2000	80 UI	30 UI hCG (IV)	-	17.8	-
	Besenfelder <i>et al.</i> 2002	120 UI	180 UI hCG (IV)	36.3	24.3	3.2
	Mehainsen <i>et al.</i> 2006	20 UI/kg	75 UI hCG (IV)	19.2	14.1	-
	Badawy <i>et al.</i> 2016	50 UI	-	20.54	-	-

OI: inducción ovulación, TO: tasa de ovulación, RE: embriones recuperados, RO: oocitos recuperados.

IV: vía intravenosa

Tabla 2. Protocolos de superovulación con FSH empleados en coneja.

TRTM.	REF.	DOSIS	IO	TO	RE	RO
FSH	Kenelly y Foote 1965	6 x 0.155 mg	5 mg LH	56,1	-	40.4
oFSH	Kauffman <i>et al.</i> 1998	6 x 0.5 mg/ 12h (SC) 8 x 0.5 mg/ 12h (SC)	150 UI hCG (IV)	25.6 23.5	19.4 23.5	2.25 0.75
pFSH	Cheng <i>et al.</i> 1999	6 x 0.3 mg/ 12h	25 UI hCG/kg	28.3	15.5	2.1
pFSH pFSH + pLH (20%)	Salveti <i>et al.</i> 2007	5 x 9 µg/ 12h (IM)	1.6 µg buserelina (IM)	26.7 27.1	21.2 20.3	-
rhFSH rhFSH + rhLH (5%) rhFSH + rhLH (10%)	Viudes-de-Castro <i>et al.</i> 2009	3 x 25 UI/ 24h (IM)	2 µg buserelina (IM)	20.24 18.46 18.41	15.59 15.93 13.72	1.62 0.96 0.59
rhFSH rhFSH + rhLH (10%) rhFSH rhFSH + rhLH (10%)	Viudes-de-Castro <i>et al.</i> 2015	18.75 UI/ 12h (IM) 37.50 UI/ 12h(IM)	1 µg buserelina (IM)	20.4 20.6 28.2 41.5	15.9 12.2 25.0 34.0	-

IO: inducción ovulación, TO: tasa de ovulación, RE: embriones recuperados, RO: oocitos recuperados.

FSHo: FSH ovina, FSHp: FSH porcina, rhFSH: FSH recombinante humana, rhLH: LH recombinante humana.

IM: vía intramuscular, IV: vía intravenosa, SC: vía subcutánea.

Como se puede observar en los resultados de las tablas, existe una gran variabilidad de respuesta en función del tratamiento de superovulación empleado, la cual depende principalmente de la dosis, la vía de administración y de la composición de los productos empleados (Aggarwal *et al.*, 1980), concretamente el ratio LH:FSH. De esta forma, se ha estudiado el efecto de la LH en la estimulación ovárica en conejas, mediante el uso de pFSH purificada, obteniendo resultados altamente variables (Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007). Más recientemente, Viudes-de-Castro *et al.* realizó dos estudios usando diferentes protocolos de administración de rhLH y rhFSH. En el primer estudio (2009), se comprobó que la concentración endógena de LH era suficiente para duplicar la tasa de ovulación en conejas tratadas con bajas dosis de FSH, mientras que esta concentración resultaba insuficiente al ser tratadas con altas dosis de FSH (2015). De los resultados obtenidos,

dedujeron que el umbral de LH en conejos era dependiente de la dosis de FSH empleada. Además, los diferentes autores mencionados comprobaron que la respuesta al tratamiento también se ve influenciada por otros factores como la edad, el estado fisiológico de la coneja y su estirpe genética, lo que hace difícil establecer comparaciones entre los estudios realizados.

Para una correcto estudio de la respuesta a los tratamientos, además de la tasa de ovulación y de recuperación de óvulos y embriones, es necesario evaluar la calidad de los mismos atendiendo tanto a los criterios morfológicos de acuerdo con la clasificación de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones como a la tasa de fecundación y desarrollo *in vitro* e *in vivo*. Otros aspectos importantes a evaluar son el perfil de expresión de determinados genes relacionados con el desarrollo embrionario (Viudes-de-Castro *et al.*, 2015), así como varios factores relacionados con el metabolismo (Cortell *et al.*, 2015).

Los tratamientos de superovulación, tanto con eCG como con FSH y LH, pueden implicar una disminución de la calidad de los embriones (Cortell, 2012), debido a que su administración conlleva la modificación de la concentración de los esteroides circulantes, principalmente 17 β -estradiol y progesterona (Donoghue *et al.*, 1992), que controlan el ambiente oviductal, por lo que afectará a la correcta sincronización entre el embrión y el endometrio durante la inseminación y fecundación, influyendo de este modo en la tasa de ovulación y en el número de embriones recuperados al final del proceso (Greve and Callesen, 2001; González-Bulnes *et al.*, 2000). Además, estos tratamientos pueden dar lugar al reclutamiento de óvulos que no se han diferenciado adecuadamente (Sirard *et al.*, 2006).

Pese a que varios autores no han encontrado diferencias significativas en la calidad de los embriones entre hembras superovuladas y no tratadas (Salvetti *et al.*, 2007; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009-2015), otros autores sí que han observado que los tratamientos de superovulación con altas dosis de eCG o FSH pueden generar gran cantidad de folículos anormales e inmaduros (García Ximénez and Vicente, 1990; Schmidt *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1988), pudiendo provocar, adicionalmente, el descenso de la tasa de recuperación de embriones (Kennelly y Foote, 1965; Hafez, 1969; Schmidt *et al.*, 1992), defectos citogenéticos y alteraciones cromosómicas en los mismos (Fecheimer and Beatty, 1974; Paufler *et al.*, 1975). Asimismo, otros estudios realizados por Van de Weijer *et al.* (2003) y Hasser *et al.* (2011), en los que utilizaron FSH comerciales derivados de extractos de pituitaria con cantidades indefinidas de LH, mostraron una variación considerable en la respuesta entre lotes; ésta podría deberse a que una mayor cantidad de LH produce la activación de receptores de LH y una luteinización prematura, provocando así una ovulación temprana y una disminución de los ratios de fecundación y producción de embriones. En 2014, Herreros demostró que las isoformas de LH presentes en los preparados de FSH también podían interferir en la efectividad del tratamiento. A pesar de todos lo estudios realizados al respecto, aún no se ha esclarecido totalmente el papel de la LH en los tratamientos de superovulación.

En el caso de los tratamientos de superovulación con eCG en conejo, se han observado los siguientes efectos adversos:

- Disminución en la tasa de ovocitos liberados en el estadio esperado (Chrenek *et al.*, 1998).
- Aumento de las anormalidades cromosómicas y de la sensibilidad a la crioconservación en embriones (Fujimoto *et al.*, 1974; Mehaisen *et al.*, 2005).

En cuanto a los tratamientos con FSH en conejo, se han descrito los siguientes efectos negativos:

- Aumento de los folículos hemorrágicos, de los fallos de fecundación y de la sensibilidad a la criopreservación (Salveti *et al.*, 2007; Mehaisen *et al.*, 2005).
- Disminución de la tasa de desarrollo de embriones y del número de nacidos vivos tras la crioconservación de los embriones (Kauffman *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2005; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009)

Como ya se ha comentado previamente, el uso de FSH en los tratamientos de superovulación presenta claras ventajas frente al uso de eCG. Por un lado, con FSH se obtienen tasas de ovulación superiores y una menor incidencia de folículos anaovulatorios (Garde y Gallego, 1996), y además, la eCG posee mayor cantidad de efectos adversos debido a su larga vida media (Lopes da Costa *et al.*, 2001; Mehaisen *et al.*, 2005).

En los últimos años, se han ensayado otras alternativas a estos procedimientos de administración para simplificar los protocolos empleados y minimizar el estrés que puedan sufrir las hembras durante su manipulación (Cortell, 2012). Una de estas alternativas, es el uso de macromoléculas como vehículo de la FSH; por ejemplo, en el estudio de Hasimoto *et al.* (2007) en conejo, se obtuvieron resultados satisfactorios al emplear hidróxido de aluminio como vehículo; mientras que los resultados obtenidos del uso de la Polivinilpirrolidona (PVP), mostraron una alta variabilidad en los resultados (Kanayama *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007; Salvetti *et al.*, 2008). Otro tipo de alternativa más reciente es el uso de gonadotropinas recombinantes, las cuales poseen una mayor vida media en circulación producida mediante ingeniería genética (Perlman *et al.*, 2003; Trousdale *et al.*, 2009) o por la adición de una secuencia de ADN codificante para una proteína altamente glicosilada a una parte de la FSH.

Estas nuevas técnicas de ingeniería genética para generar gonadotropinas recombinantes han permitido conseguir FSH con un alto grado de pureza; sin embargo, suponen elevados costes pues requieren de una glicosilación post-traduccional (Herreros, 2014). Estos preparados se obtienen a partir de células animales transgénicas, en cuyo genoma se han incorporado los genes responsables de codificar las subunidades alfa y beta de la FSH (Hesser *et al.*, 2011; Herreros, 2014). El método más común para producir rhFSH es la expresión heteróloga en células de ovario de hámster chino (CHO), una línea celular capaz de realizar modificaciones post-traduccionales en la proteína nativa (Hesser *et al.*, 2011). De esta forma, se obtiene FSH pura sin contaminación por LH u otras sustancias, por lo que no hay riesgos de infección o de reacciones alérgicas, y no se produce variaciones significativas de un lote a otro.

El tratamiento utilizado en el presente estudio se basó en la utilización de FSH de larga duración denominada corifolitropina alfa, Elonva o FSH-CTP (Leao and Esteves, 2014). Esta FSH recombinante es una molécula híbrida originada por la combinación de la alfa-subunidad de la FSH humana con la beta-subunidad de la gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual consiste en un péptido carboxilo-terminal (CTP) (Campbell 2005; Verbost *et al.*, 2011), mediante técnicas de mutagénesis dirigida de sitio y de transferencia de genes (Fauser *et al.*, 2009). Su mayor vida media en el plasma es debida al CTP de la hCG, este péptido incluye cuatro cadenas adicionales de carbohidratos unidas a oxígeno, cada una con dos residuos de ácido siálico en su terminal, las cuales interactúan exclusivamente con los receptores de FSH. La corifolitropina alfa tiene aproximadamente el doble de vida media (65 horas de vida media en el plasma) y un tiempo de prolongación de casi cuatro veces

mayor en los niveles séricos (Duijkers *et al.*, 2002; Devroey *et al.*, 2009). Por lo tanto, una simple inyección de FSH-CTP puede remplazar el perfil farmacocinético de los procedimientos estándares de 7 inyecciones diarias de gonadotropinas y apoyar el crecimiento multi-folicular durante una semana entera, reduciendo así la manipulación de los animales. (Balen *et al.*, 2004; Devroey *et al.*, 2009).

1.3 Crioconservación embrionaria en conejos

El término de crioconservación hace referencia a la preservación de células y tejidos a temperaturas que permiten la inactivación reversible del metabolismo celular, manteniendo la integridad celular y tisular de forma indefinida. Los óvulos, espermatozoides y embriones se suelen conservar en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C (Hafez, 2000). Los embriones de mamífero se han congelado y almacenado con éxito desde finales del siglo XIX, cuando se logró obtener por primera vez descendencia de la congelación de embriones de ratón (Whittingham *et al.*, 1972), aunque no fue hasta en 1985, por parte de Rall y Fahy, cuando se introdujo la vitrificación como un método revolucionario para la crioconservación de embriones. El primer protocolo de vitrificación en conejos se elaboró en 1989 de la mano de Smorag *et al.*, al cual le siguieron los protocolos de Kassei *et al.* (1992) y Vicente y García-Ximénez (1994) con un porcentaje de supervivencia superior al 50%. Estos métodos de crioconservación permitieron el establecimiento de bancos de embriones para la preservación de recursos genéticos de poblaciones de conejos silvestres o razas seleccionadas (García *et al.*, 2000a; Bolet *et al.*, 2001; Mounolou *et al.*, 2003; Lavara *et al.*, 2011), además de ofrecer nuevas posibilidades en programas de selección genética para minimizar el impacto de la deriva genética, estudiar el progreso genético o facilitar la difusión de las líneas a diferentes países (García *et al.*, 2000b).

Como contrapartida, la crioconservación puede generar daños producidos por la formación de hielo intracelular, el estrés osmótico o por la toxicidad de las sustancias contenidas en los medios. La presencia de hielo intracelular puede prevenirse mediante el uso de crioprotectores, los cuales se pueden diferenciar en tres tipos: crioprotectores permeables de bajo peso molecular (etilen glicol -EG-, propanodiol -PROH-, dimetilsulfóxido -DMSO-, glicerol, etc.), crioprotectores no permeables de bajo peso molecular (galactosa, sacarosa, trehalosa, etc.), y crioprotectores no permeables de alto peso molecular (PVP, etc.). Su concentración y el uso de varios de ellos va a depender del procedimiento de crioconservación utilizado y de su toxicidad en relación con el material biológico a preservar.

En la actualidad se pueden establecer un mínimo de dos métodos principales para la crioconservación de embriones en base a la concentración de crioprotectores en el medio y la velocidad de enfriamiento; estos factores determinan la formación o no de cristales de hielo y si el embrión puede alcanzar o no el equilibrio osmótico durante el proceso. De esta forma, se definen los protocolos de congelación lenta, con baja concentración de crioprotectores y una lenta velocidad de enfriamiento; y de vitrificación, con alta concentración de crioprotectores y una rápida velocidad de enfriamiento.

La técnica de congelación lenta ha sido utilizada con éxito en una gran variedad de especies incluyendo el conejo, obteniéndose resultados similares a los que proporciona la vitrificación, 20-57% de viabilidad al nacimiento (Joly *et al.*, 1996). La congelación de embriones de conejo fue lograda por primera vez con éxito por Bank y Maurer (1974) con embriones de 8 células. Posteriormente, se observó que los resultados y las condiciones óptimas variaban en función del estadio de desarrollo (Bank y Maurer, 1974), del tratamiento

hormonal para obtener los embriones (Renard *et al.*, 1984) y del genotipo de la estirpe de origen del embrión y de la receptora (Vicnete y García, 1993; Joly *et al.*, 1996).

En el procedimiento de vitrificación, los embriones se mezclan con una solución de elevada concentración de crioprotectores y se someten a un enfriamiento ultrarápido mediante su inmersión en nitrógeno líquido; de esta forma se establece una estructura vítrea sin posibilidad de que las moléculas de agua formen cristales de hielo. El estado vítreo mantiene la distribución espacial molecular e iónica del líquido, pudiendo considerarse como un líquido superenfriado extremadamente denso.

En conejos, Smorag *et al.* (1989) y Kobayashi *et al.* (1990) constataron que las mejores soluciones para la vitrificación contenían glicerol y propilenglicol; sin embargo, las proporciones de embriones desarrollados con esos protocolos no fueron satisfactorias (18-27%), pudiéndose deber a la alta toxicidad de los crioprotectores. De esta forma, se estableció como factor limitante del éxito de la vitrificación la solución de crioprotectores, teniendo en cuenta su toxicidad, tiempo de exposición y temperatura durante el equilibrado de los embriones. Algunos autores como Vicente y García Ximénez (1994) sometieron a los embriones de conejo a soluciones con altas concentraciones de crioprotectores permeables (EG y DMSO). Otros autores como López-Béjar y López-Gatius (2000), utilizaron únicamente el crioprotector etilenglicol con la adición de sacarosa. Kasai *et al.* (1992) estudiaron la tasa de supervivencia de mórulas de conejo expuestas a una solución de vitrificación de PBS con 40% de EG + 18% Ficoll + 0.3 M Sacarosa (EFS) durante 2, 5 y 10 min a 20 °C y, posteriormente sumergidas en nitrógeno líquido; su objetivo era la evaluación de un crioprotector con menor toxicidad como el Ficoll. En el estudio describieron que el porcentaje de embriones que se habían desarrollado hasta blastocisto expandido era menor cuanto mayor era su tiempo de exposición a la solución (87, 40 y 17%, respectivamente). Además, obtuvieron un total de 65% fetos tras la transferencia de embriones vitrificados en una solución EFS durante 2 min. Otro protocolo de vitrificación, descrito por García-Ximénez *et al.* (1996) constaba de dos pasos: primero, los embriones eran pipeteados en 0.2 mL de PBS en una placa de cultivo para, posteriormente, añadir y diluir 0.2 mL de una solución 25% EG + 25% DMSO en PBS. Después de 2 minutos, se añadieron 0.6 mL de la misma solución crioprotectora y los embriones se mantuvieron en la solución final de vitrificación (20% EG + 20% DMSO en PBS) a 20 °C durante 1 minuto para, seguidamente, introducirlos directamente en nitrógeno líquido. Los resultados obtenidos en este estudio aseguraron la estabilización de una línea maternal de conejos con un 47% de nacidos vivos y un 42% de eficiencia total tras las transferencias. Además, se constató la posible adición de otros elementos a la solución de vitrificación como suero de coneja o BSA para mejorar la eficiencia del proceso (Vicente *et al.*, 1999). En el proceso de vitrificación, el estadio de desarrollo del embrión, el tratamiento de las conejas donantes, su estirpe y la de la receptora, y la sincronización embrión-endometrio son aún más determinantes que en la congelación para la supervivencia posterior (Smorag *et al.*, 1989; López-Béjar *et al.*, 1994; Mehainsen *et al.*, 2005; Lavara *et al.*, 2011; Marco-Jiménez *et al.*, 2013).

La crioconservación puede resultar perjudicial para la organización celular del embrión por varios motivos entre los que destaca el efecto de la temperatura; la exposición de embriones a bajas temperaturas ejerce directamente un efecto negativo sobre los enzimas catalizadores de las reacciones bioquímicas, provocando roturas y alteraciones en la organización de las membranas, lo que conlleva a la pérdida gradual de la viabilidad. La magnitud de los daños celulares depende de varios factores, como el protocolo de crioconservación (medios, envases, velocidades de enfriamiento y calentamiento), especie,

etapa del desarrollo del embrión y sistema de producción de embriones, entre otros (Fabian *et al.*, 2005).

Los protocolos de congelación pueden provocar la disrupción de orgánulos celulares como el citoesqueleto, o efectos tóxicos debido a los crioprotectores (Dobrinsky, 1996), mientras que durante la vitrificación los embriones pueden ser dañados por la toxicidad de los crioprotectores (Baguisi *et al.*, 1999), efectos osmóticos adversos (Kasai, 1995), y por fenómenos de cristalización durante el calentamiento (Viudes-de-Castro *et al.*, 2010). La formulación adecuada de crioprotectores permeables, no permeables y sustancias bloqueantes de hielo permiten reducir notablemente estos efectos nocivos de la vitrificación (Fahy *et al.*, 2004).

La viabilidad de los embriones vitrificados post-vitrificación pueden ser evaluados *in vitro*, estudiando la capacidad de los embriones des-vitrificados de desarrollándose en un medio de cultivo hasta el estadio de blastocisto eclosionado (Vicente *et al.*, 1999); o bien, haciendo una evaluación *in vivo*, transfiriendo los embriones a diversas hembras receptoras (Besenfelder y Brem, 1993). Antes de determinar la viabilidad, se debe realizar un test morfológico de forma que solo aquellos embriones sin alteraciones morfológicas vayan a ser transferidos o cultivados, asegurando así el máximo ratio de desarrollo (Techakumphu y Heyman, 1987). Varios autores demostraron que el ratio de desarrollo *in vivo* de embriones era menor que el ratio de desarrollo *in vitro*, especialmente en embriones crioconservados frente a embriones frescos (Bank y Maurer, 1974; Maurer y Haseman, 1976; Tsunoda *et al.*, 1979; Renard *et al.*, 1984; Kojima *et al.*, 1985; Smorag *et al.*, 1989;). Sin embargo, otros estudios de crioconservación de embriones de conejos demostraban una alta correlación entre la evaluación post-crioconservación *in vitro* e *in vivo* (Tsunoda and Sugie, 1977; Techakumphu and Heyman, 1987; Kojima *et al.*, 1990; Kassai *et al.*, 1992). A pesar de que las dos técnicas son válidas para el estudio de la viabilidad de embriones, la evidencia definitiva para cualquier manipulación de embriones es el desarrollo *in vivo*.

La crioconservación de embriones de conejo ofrece resultados satisfactorios alcanzando entre 25-65% de viabilidad al nacimiento por embrión crioconservado frente a un 50-70% con embriones no crioconservados (Renard *et al.*, 1984; Kassai *et al.*, 1992; Vicente y García, 1994; Joly *et al.*, 1996; Vicente *et al.*, 1999; Lavara *et al.*, 2011; Marco-Jiménez *et al.*, 2013). Sin embargo, la distribución de las pérdidas embrionarias o fetales difiere entre embriones crioconservados y frescos e incluso entre procedimientos de crioconservación (Mocé *et al.*, 2012; Marco-Jiménez *et al.*, 2013)

2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este Trabajo Final de Grado son los siguientes:

- ❖ Evaluar el efecto de la corifolitropina alfa (FSH-CTP; Elonva) sobre la estimulación ovárica de la coneja y la recuperación embrionaria en conejas multíparas y nulíparas
- ❖ Evaluar la viabilidad de los embriones vitrificados obtenidos de hembras multíparas y nulíparas superovuladas, mediante su cultivo *in vitro* y transferencia *in vivo*.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño Experimental

3.2 Animales

3.3 Tratamiento de superovulación y recuperación de embriones

3.4 Protocolo de vitrificación y des-vitrificación

3.5 Viabilidad embrionaria *in vitro*. Cultivo de embriones

3.6 Viabilidad embrionaria *in vivo*. Transferencia de embriones

3.7 Análisis estadísticos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

El diseño experimental que se llevó a cabo se muestra de manera esquemática en la Figura 3. Las conejas utilizadas fueron sometidas a dos sesiones de tratamientos de superovulación y recuperación de embriones. La viabilidad de los embriones recuperados, bien sometidos a técnicas de criopreservación o no, fue evaluada *in vitro* mediante cultivo e *in vivo* mediante transferencias en hembras receptoras.

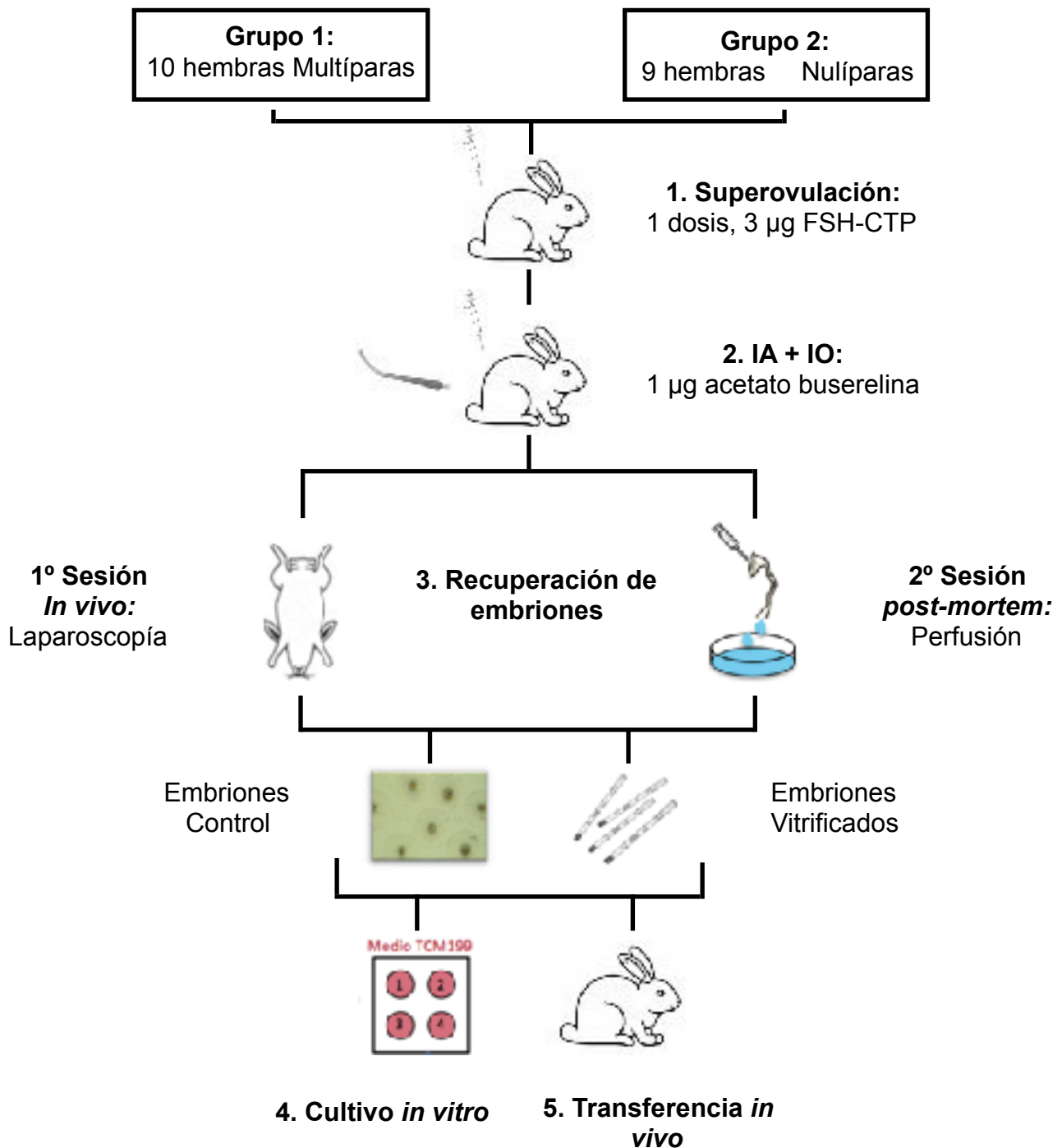


Figura 3. Diseño experimental

3.2 Animales (modelo experimental y legislación)

Los animales utilizados como donantes y receptores de embriones fueron proporcionados por las granjas cunícolas del Grupo de Mejora Genética Animal del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia. En los tratamientos de superovulación repetidos, se utilizaron un total de 19 hembras que provenían de la línea amarilla A de origen Neozelandés blanco seleccionadas desde 1980 por tamaño de camada. Las 19 hembras utilizadas se diferenciaron en dos grupos según su estado reproductivo: 9 hembras nulíparas, con una edad comprendida entre los 4 meses y medio y los 5 meses, y las 10 restantes múltíparas, con una edad mayor a un año y con un historial previo de partos (4-5 partos). Ambos tipos de hembras fueron inseminadas con machos de la misma línea A con edades comprendidas entre 8 y 12 meses. En la última fase del experimento, se utilizaron 17 hembras nulíparas como receptoras de los embriones obtenidos en los tratamientos de superovulación.

Los conejos fueron alojados en jaulas individuales bajo condiciones ambientales controladas: temperatura media diaria mínima de 17.5°C y máxima de 25.5°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y acceso libre a pienso comercial y agua filtrada. Todos los conejos fueron tratados de acuerdo a los procedimientos aprobados por la Generalitat Valenciana para la instalación cunícola nº de registro 250V091 y atendiendo a la legislación sobre la experimentación animal del Real Decreto 53/2013 (BOE, 2013).



Figura 4. Conejo de origen Neozelandés Blanco (New Zealand White)

3.3 Recuperación de embriones

3.3.1 Tratamiento de superovulación

Todas las hembras utilizadas en el estudio de superovulación fueron sometidas a un tratamiento repetido con la hormona recombinante FSH de larga duración, Corifolitropina alfa (FSH-CTP; Elonva; 150 µg/mL, Merck Sharp & Dohme S.A.; Spain), en una única dosis de 3 µg/0.5mL vía subcutánea. El tratamiento de superovulación se repitió en cada coneja dos veces, pudiéndose realizar hasta un tercero en algunas de ellas.

Como hemos mencionado previamente, las hembras se distribuyeron en dos grupos experimentales:

- Grupo 1 (N = 10): conejas múltíparas superovuladas con FSH-CTP.

- Grupo 2 (N = 9): conejas nulíparas superovuladas con FSH-CTP.

En casa sesión de trabajo, se utilizaron 4 o 6 conejas (2-3 por grupo) de pesos y edades similares para inducir superovulación, dejando un intervalo mínimo de 30 días para repetir el tratamiento en la misma coneja.

3.3.2 Inseminación artificial y Evaluación del semen

Las conejas fueron inseminadas 60 horas después del tratamiento de superovulación con 0.5 mL de una mezcla heterospermica, y se les indujo la ovulación con 1 µg de acetato de buserelina (Suprefact; Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, Spain) vía intramuscular.

El semen utilizado se recuperó el mismo día mediante el empleo de vaginas artificiales según el método descrito por Vicente *et al.* (2011). La muestra seminal recogida se diluyó en 1:5 en Tris-Cítrico-Glucosa [0.25 M Tris (hidroximetil) aminometano, 83 mM ácido cítrico, 47 mM Glucosa] y se observó en un microscopio con óptica de contraste de fases para evaluar su calidad antes de su utilización. Más tarde, se analizó la muestra mediante el software ISAS, el cual calcula la concentración y motilidad del eyaculado, mediante una alícuota de la mezcla heterospermica colocada en una cámara Makler atemperada a 37°C. Con este programa, se analizaron todas las muestras de semen utilizadas en el experimento.

En cada una de las sesiones, se utilizaron tres eyaculados para constituir la mezcla heterospermica, con una motilidad espermática superior al 70% y un porcentaje de espermatozoides anormales inferior al 25%. Estos requisitos de motilidad y anomalías, son los comúnmente empleados en la inseminación artificial (Marco *et al.*, 2010). En la Figura 5 podemos observar una mezcla heterospermica que cumple los requisitos comentados.

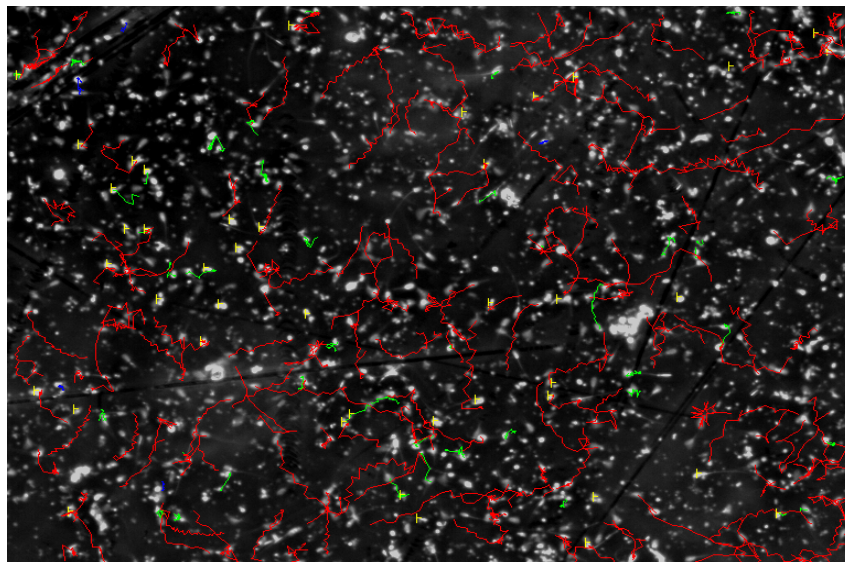


Figura 5. Imagen resultante del ISAS de una muestra heterospermica utilizada en la inseminación de las conejas superovuladas.

3.3.3 Recuperación de embriones *in vivo* y post-mortem

Durante el primer tratamiento, todas las hembras fueron sometidas a la técnica de laparoscopia 72-74 horas después de la inseminación de acuerdo con el método descrito por Besenfelder *et al.*, 1998, con el fin de medir la tasa de ovulación y de recuperar los embriones *in vivo*. Antes de comenzar la operación, todas las hembras fueron sedadas mediante una inyección intramuscular de 16 mg de xilacina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Germany) seguida de otra inyección intravenosa de 16-20 mg de ketamina hidrociorada (Imalgène, Merial S.A., Lyon, France). La hembra donante de embriones se posicionó decúbito supino sobre un potro inclinado 45°. Primero, se le introdujo una aguja de Verres en la cavidad abdominal para distender el abdomen mediante la introducción de CO₂. Una vez distendido, se retiró la aguja de Verres y se le instaló un trocar de 10 mm para poder introducir el laparoscopio (Wolf paediatric 0°). Seguidamente, se colocó un segundo trocar de 5 mm sobre la línea medioclavicular derecha y a 3 cm por encima de la cicatriz umbilical, por donde se introdujo una pinza de 28.5 cm de longitud para manipular los oviductos. Antes de la extracción, se le introdujo una aguja de epidural (1 mm de diámetro interno, Vigor Epidural G17) cerca del ovario, unida a un tubo estéril de polietileno (diámetro interno de 0.3 mm), unido a su vez a una jeringuilla estéril permitiendo el acceso al oviducto para su manipulación. Después de la fijación del oviducto con las pinzas, por su abertura se le introdujo 5 mL de medio de recuperación con tampón fosfato salino (PBS) para desplazar los óvulos y embriones hasta el cuerno uterino. Finalmente, se introdujeron otros 50 mL de medio de recuperación en los cuernos uterinos, previamente elevados con las pinzas situadas cerca de la unión con el oviducto, insertando la aguja de epidural estéril directamente en la pared abdominal del cuerno uterino. El medio de recuperación junto con los óvulos y embriones fueron recogidos de la vagina mediante un catéter de foley (Minitüb, CH12) unido a una bomba de aire (10-20 mmHg), para su posterior evaluación. En la Figura 6 se puede observar la posición decúbito supino durante el procedimiento de laparoscopia.



Figura 6. Colocación de la coneja en posición decúbito supino para la laparoscopia. En el centro se observan el trocar intraabdominal, endoscopio y cámara digital

En el segundo tratamiento, la mayoría de las recuperaciones de embriones fueron realizadas *post-mortem*, 72-74 horas después de la inseminación. Las conejas fueron sacrificadas mediante la administración intravenosa de 1 mL/kg de pentobarbital sódico (Dolethal, V etoquinol especialidades veterinarias, S.A., Vétoquinol, Madrid, Spain), y se les extirpó el aparato reproductor para llevar a cabo la recuperación de embriones mediante la perfusión de cada oviducto con 10 mL de tampón fosfato salino (DPBS, Dulbecco's phosphate buffer serum) suplementado con 0.2% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.132 g/L de CaCl_2 + y antibiótico (penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI y sulfato de dihidroestreptomicina 1250 mg/L, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, Spain), atemperado a 37°C.

Ambos medios de recuperación, tanto el obtenido por laparoscopia como el proveniente de la perfusión de los cuernos uterinos, se recogieron en placas Petri estériles de 60 mm y, bajo lupa binocular, se procedió a la clasificación de los óvulos y embriones. Parte de los embriones en buen estado se usaron directamente como embriones control, mientras que el resto fueron vitrificados para su uso posterior. En lotes de aproximadamente 15 embriones, se procedió a la evaluación de su viabilidad mediante su cultivo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto eclosionado y por su transferencia *in vivo* a hembras receptoras. Los embriones se clasificaron atendiendo a un criterio morfológico, considerando como embriones normales a aquellos en forma de mórula compacta o estado de blastocisto temprano que presentan una masa homogénea de células y no presenta ningún tipo de anomalía en la capa de mucina o la zona pelúcida. En la Figura 7 se pueden observar un lote de embriones normales recuperados.

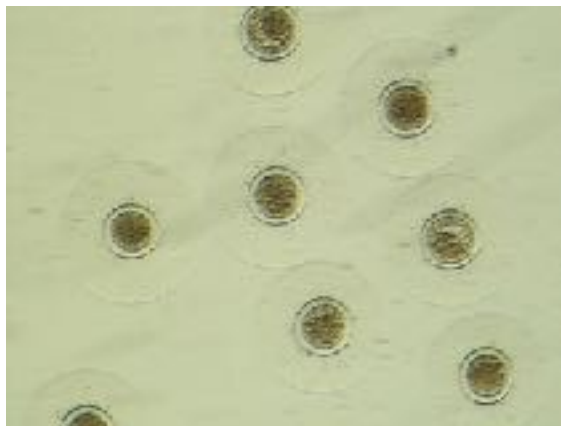


Figura 7. Embriones recuperados observados bajo lupa binocular. Solamente aquellos embriones con la capa de mucina intacta fueron seleccionados.

Se valoró la tasa de ovulación mediante el conteo de los folículos con cicatrices de ovulación. En la Figura 8, se puede observar la el aspecto de un ovario superovulado.

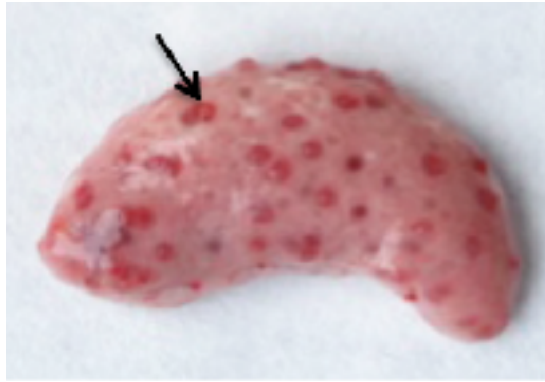


Figura 8. Ovario superovulado con folículos con cicatrices de ovulación

3.4 Proceso de Vitrificación y Des-Vitrificación

Parte de los embriones recuperados en estadio de mórula o blastocisto temprano fueron vitrificados en lotes de aproximadamente 15 embriones siguiendo la metodología descrita por Vicente *et al.* (1999). Resumiendo, el procedimiento de vitrificación fue llevado a cabo en dos pasos a una temperatura ambiente de 20°. En el primer paso, los embriones fueron depositado durante 2 minutos en una solución de vitrificación compuesta de 12.5% (v/v) de dimetil sulfoxido (3.5 M DMSO, Sigma) y un 12.5% (v/v) de etilenglicol (4.4 M EG, Sigma) en DPBS suplementado con 0.2% (w/v) de BSA. En el segundo paso, los embriones fueron suspendidos durante 1 minuto en una solución del 20% (v/v) DMSO y 20% (v/v) EG en DPBS suplementado con 0.2% (w/v) de BSA. Los embriones suspendidos en el medio de vitrificación fueron cargados en pajuelas de plástico de 0.25 mL (IMV, L'Aigle, France) con cuidado de no formar burbujas de aire. Finalmente, las pajuelas fueron selladas y se introdujeron directamente en nitrógeno líquido.

La des-vitrificación se realizó sumergiendo las secciones central y final de las pajuelas en un baño de agua a 20°C durante 10-15 s. El medio de vitrificación fue eliminado en dos pasos, primero los embriones fueron expulsados con el medio en una solución de DPBS con 0.33 M de sacarosa durante 5 minutos, y después fueron lavados en una solución de DPBS durante otros 5 minutos. Estos embriones recuperados fueron, o bien directamente transferidos a hembras receptoras, o bien cultivados *in vitro*.

Estos métodos de desarrollo de embriones permitieron el estudio total de la viabilidad de embriones vitrificados o no (controles) y procedentes de nulíparas o múltiparas.

3.5 Viabilidad embrionaria *in vitro*. Cultivo de embriones

Un total de 258 embriones procedentes de conejas múltiparas y nulíparas, vitrificados y no vitrificados (control) fueron evaluados *in vitro*. Para ello, se prepararon diversas placas Nuc con 500 MicroL de medio de cultivo TCM199 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con antibióticos (penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G peocaina 700.000 UI y sulfato de dihidroestreptomicina 1250 mg/L, Penivet 1, Divasa Farmavis, Barcelona, España) y con un 10% de suero fetal bovino (FBS). En función del origen y tipo de embrión se distinguieron 4 grupos experimentales:

- Grupo 1: 141 embriones control (C) procedentes de múltíparas (ML).
- Grupo 2: 117 embriones vitrificados (V) procedentes de múltíparas (ML).
- Grupo 3: 124 embriones control (C) procedentes de nulíparas (NL).
- Grupo 4: 134 embriones vitrificados (V) procedentes de nulíparas (NL).

Los embriones se cultivaron *in vitro* (CIV) durante 48 horas en una estufa a una temperatura de 38°C y a una atmósfera controlada con un 5% de CO₂. Transcurridas las 48h, se anotó el número de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto y de aquellos que fueron capaces de remodelar su zona pelúcida y cubierta de mucina para lograr expandirse. En la Figura 9, se pueden observar los diferentes estadios de embriones en un cultivo *in vitro*.

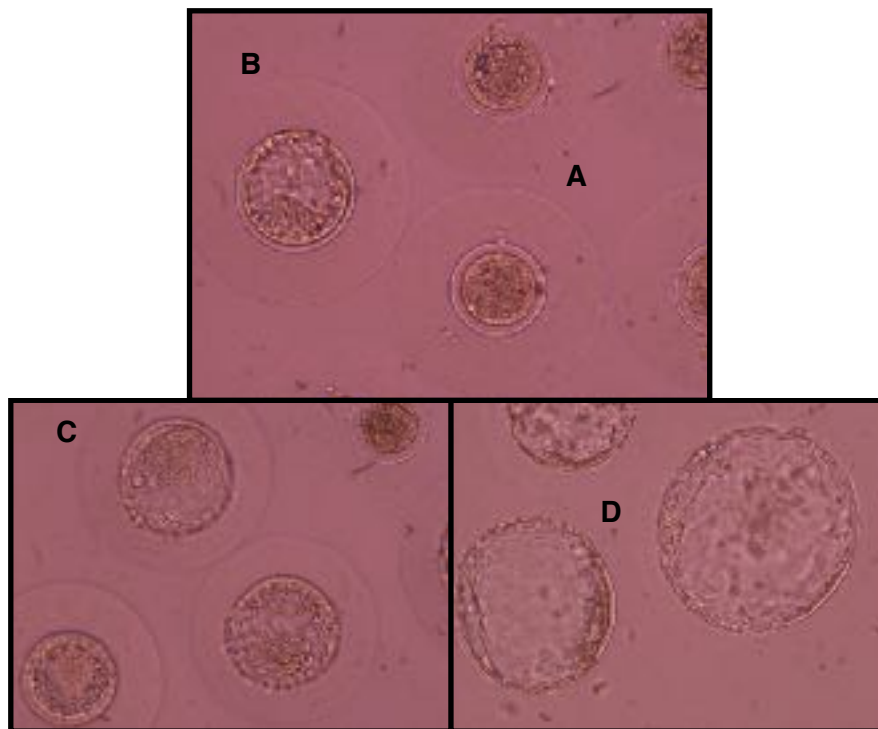


Figura 9. Desarrollo embrionario *in vitro*. A. Mórula, B. Blastocisto, C. Blastocisto en expansión, D. Blastocisto expandido.

3.6 Viabilidad embrionaria *in vivo*. Transferencia de embriones

Se realizaron 17 transferencias de embriones, cuatro por cada grupo experimental programado, transfiriendo un total de 186 embriones procedentes de nulíparas o múltíparas, en estado vitrificado o como control. Las 17 hembras escogidas para la transferencia fueron seleccionadas en función de la turgencia y el color de la vulva, indicativo de celo. Según la procedencia y el estado de los embriones transferidos, se diferenciaron cuatro grupos experimentales:

- Grupo 1: 4 hembras receptoras de un total de 45 embriones frescos procedentes de hembras múltíparas.

- Grupo 2: 4 hembras receptoras de 53 embriones vitrificados procedentes de hembras múltiparas.
- Grupo 3: 4 hembras receptoras de 49 embriones frescos procedentes de hembras nulíparas.
- Grupo 4: 4 hembras receptoras de 50 embriones vitrificados procedentes de hembras nulíparas.

Para el estudio de la viabilidad *in vivo*, las hembras receptoras fueron inducidas a ovular con 1 µg de acetato de buserelina (Hoechst, Marion Roussel, Madrid, Spain) vía intramuscular, 72 horas antes de la transferencia. Las hembras sincronizadas fueron anestesiadas mediante una inyección intramuscular con 16 mg de xilacina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Germany) seguida de una inyección intravenosa de 16-20 mg de ketamina hidroclicídrica (Imalgène, Merial S.A., Lyon, France). La transferencia de embriones en el oviducto fue realizada mediante laparoscopia (Besenfelder y Brem, 1993), procedimiento descrito en el apartado de recogida de embriones *in vivo*. El número de embriones transferidos por receptora varió entre 11 a 16 en función del lote del que se dispuso. Al final de la transferencia, se les inyectó 0.5 mL/coneja de enrofloxacin (Baytril 5%, Bayer, Barcelona, Spain) vía intramuscular. Las conejas transferidas se devolvieron a sus respectivas jaulas, alimentadas con una dieta estándar *ad libitum* y con acceso libre de agua.

3.7 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002). Los resultados se presentaron como la media ajustada por mínimos cuadrados (LSM) junto a su error estándar. La significancia estadística de las variables fijas se determinó mediante un test de Fisher, considerándose como significativas, aquellas variables con un p-value < 0.05.

Para evaluar el efecto del tratamiento de superovulación sobre la tasa de ovulación (número de folículos con cicatriz de ovulación, TO), tasa recuperación = $([\text{óvulos} + \text{embriones recuperados}] / \text{TO}) * 100$ y la eficiencia de la recuperación de embriones normales $(\text{embriones normales} / \text{TO}) * 100$. Se realizó un análisis de varianza univariante empleando un modelo lineal general en el que se establecieron como factores fijos el estado fisiológico de la hembra (múltiparas-ML- o nulíparas-NL) y la sesión de tratamiento (primero o segundo).

Los análisis estadísticos correspondientes a la viabilidad *in vitro* y supervivencia al nacimiento se realizaron mediante la función binomial *probit link*, en el que el modelo lineal general incluía el origen de los embriones (ML o NL), su estado (vitrificado o fresco) y su interacción. Se asignaron valores binomiales a la tasa de supervivencia *in vivo* y a la tasa de desarrollo a blastocisto *in vitro*. De esta forma, tanto los embriones que llegaron a nacer como los embriones desarrollados hasta blastocisto expandido (hatched) recibían un valor de 1, mientras que aquellos que no sobrevivían o no se desarrollaban hasta ese estadio se les asignaba un valor de 0.

4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1

Efecto de la estimulación ovárica sobre la tasa de ovulación y recuperación de embriones.

4.2

Efectos de las técnicas de superovulación y crioconservación sobre el desarrollo embrionario *in vitro*.

4.3

Efectos de las técnicas de superovulación y crioconservación sobre el desarrollo embrionario *in vivo*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efectos de la estimulación ovárica sobre la tasa de ovulación y la recuperación de embriones

Como se ha mencionado en el apartado de introducción, los tratamientos de estimulación ovárica pueden provocar procesos anovulatorios o embriones anormales. En nuestro estudio, 4 hembras núlparas de 9 no consiguieron inducir la ovulación a pesar de haber respondido favorablemente al tratamiento; de éstas, 3 fallaron en ambas sesiones del tratamiento. Estos fallos de ovulación se han descrito previamente por Mehaisen *et al.* (2006) con eCG y oFSH, Salvetti *et al.* (2007) con pFSH purificada con o sin la suplementación de LH y por Viudes-de-Castro *et al.* (2009) con rhFSH sola o en combinación de rhLH; lo que sugiere que el uso de gonadotropinas exógenas en tratamientos de superovulación puede afectar a la liberación de LH endógena debido a un incremento de estradiol y progesterona en la concentración plasmática que interferiría en el feedback positivo del estradiol en la secreción de LH, bloqueando así el proceso de ovulación (Gosselin *et al.*, 2000). Otra posible causa del fallo de ovulación es que el tratamiento de superovulación con corifolitropina alfa provoque un desarrollo insuficiente de los folículos en las conejas núlparas caracterizado por la falta de receptores de LH, este punto debe ser estudiado en próximos trabajos. En la Figura 10 podemos observar el aspecto de un ovario sin folículos ovulados.



Figura 10. Ovario superovulado no inducido carente de cicatrices de ovulación

Además de los fallos de ovulación, otras anomalías relacionadas con el desarrollo folicular como los folículos hemorrágicos fueron observadas en concretamente 4 conejas; estas anomalías podrían sugerir una insuficiente presencia de receptores LH o de secreción hipofisaria de LH. La presencia de folículos hemorrágicos en conejas sometidas a tratamientos de superovulación ha sido previamente descrito por Kenelly and Foote (1965), Renard *et al.* (1982), Kim *et al.* (1988), García Ximénez y Vicente (1990) y Salvetti *et al.* (2007).

Para evaluar la respuesta al tratamiento se estudiaron la tasa de ovulación, tasa de recuperación y porcentaje de embriones normales para cada factor empleado (estado fisiológico de la hembra: múltiparas-ML y núlparas-NL; y sesión del tratamiento: primera y segunda). De estos, se observaron diferencias significativas en la tasa de ovulación en

función del tipo de hembra, siendo las nulíparas las que obtuvieron una mayor respuesta. En la Tabla 3 y en la Figura 12, se pueden observar los resultados obtenidos.

Tabla 3. Efecto del tratamiento de superovulación repetido sobre la tasa de ovulación y recuperación de embriones.

Factor	Variable	N	Tasa de ovulación	Tasa de recuperación (%)	Eficiencia de recuperación de embriones normales (%)
Estado Hembra	ML	17	31.5 ± 2.8 ^b	76.1 ± 7.9	65,8 ± 8,1
	NL	13	40.6 ± 3.2 ^a	70.8 ± 9	91,2 ± 10,1
Sesión tratamiento	1º	15	37.9 ± 3	77.3 ± 8.6	80,9 ± 9,3
	2º	15	34.2 ± 3	69.5 ± 8.4	76,2 ± 9,0
Total		19	36.03 ± 2.1	73.4 ± 6	78.5% ± 6.5

N: número de conejas utilizadas en el experimento

ML: hembras múltiparas

NL: hembras nulíparas

Los datos se muestran como $ms \pm es$: medias ajustadas por mínimos cuadrados \pm error estándar
a,b Valores en las columnas con diferente superíndice que difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

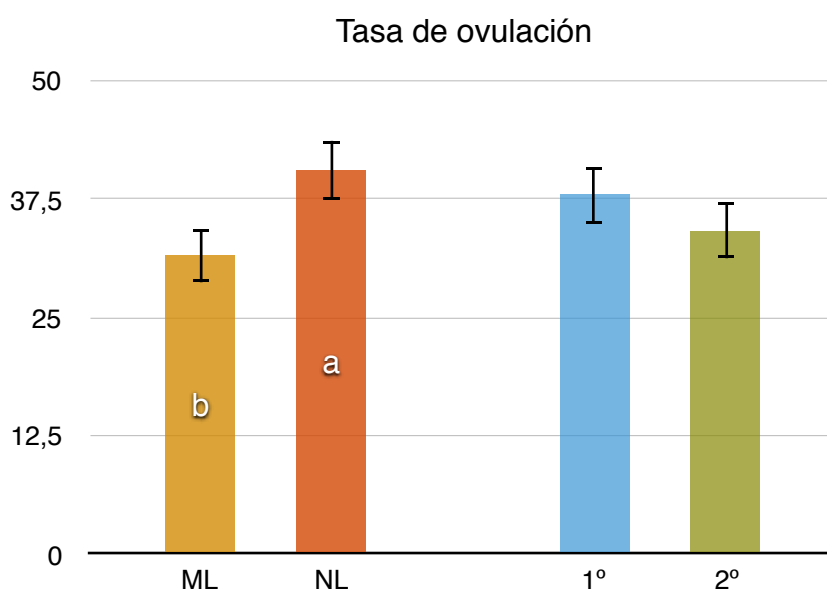


Figura 11. Tasa de ovulación obtenida para los factores estado fisiológico (Multipara-ML, Nulíparas-NL) y sesión de tratamiento (1º y 2º).

Como se puede observar en la Tabla 3, ambos grupos de hembras habían producido un incremento del número de folículos ovulados ($TO = 36.03 \pm 2.1$) respecto a las tasas de ovulación caracterizadas en esta línea (13-16) (Vicente *et al.*, 2003, Gamal *et al.*, 2005), así como una respuesta similar o ligeramente superior a otros estudios previamente publicados en conejas sometidas a tratamientos con FSH de distinto origen, con unas tasas de ovulación entre 16 y 40 (Tabla 2., Hashimoto *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009). Las tasas de recuperación de embriones (73.4 ± 6) fueron similares a las obtenidas por Vicente *et al.* (2003) y Gamal *et al.* (2005) en la misma

línea de coneja, con unos valores del 74 y 56,2% respectivamente, y a las observadas en la Tabla 2, donde se establece un intervalo de recuperación entre 65-85%. Del total de folículos ovulados (estima de la tasa de ovulación) se obtuvo un $78.5\% \pm 6.5$ de embriones normales, estas tasas son similares a las que se obtienen en conejas no superovuladas cuando se recuperan embriones a 72h (80-82%, Vicente y García-Ximénez, 1991 y Vicente *et al.*, 2003).

En el presente estudio, la repetición del tratamiento no mostró diferencias significativas, obteniéndose unas tasas de ovulación de 37.89 ± 3 y 34.28 ± 2.9 , en la primera y segunda sesión respectivamente. Estos resultados contrastan con los descritos anteriormente por autores como Renard *et al.* (1982), Theau-Clément *et al.* (1998); Drion *et al.* (2001); Gamal *et al.* (2005) y Viudes-de-Castro *et al.* (2009), quienes observaron una disminución en la tasa de ovulación y en el número de embriones recuperados en tratamientos repetidos con FSH, debida a la formación de anticuerpos anti-gonadotropinas en la sangre del animal tras la repetición del tratamiento.

El estado fisiológico de la hembra tratada sí mostró diferencias significativas en cuanto al número de cicatrices de ovulación, con unas tasas de ovulación de $40.59\% \pm 3.17$ y $31.47\% \pm 2.77$ para hembras nulíparas y múltiparas, respectivamente; sin embargo no presentaron diferencias en cuanto a la tasa y eficiencia de la recuperación. Aún a pesar de no ser significativa, hay que señalar que se observa una disminución de la eficiencia en la recuperación de embriones normales en las hembras múltiparas ($65.8\% \pm 8.1\%$ frente a $91.2\% \pm 10.1\%$, respectivamente, $p = 0.061$, tabla 3).

4.2 Efectos de las técnicas de superovulación y crioconservación sobre el desarrollo embrionario *in vitro*

Un total de 258 embriones fueron cultivados en un medio TCM199 suplementado con suero con objetivo de evaluar el desarrollo embrionario *in vitro* de los embriones, vitrificados (V) o no (control-C), procedentes de ambos grupos de conejas (múltiparas-ML y nulíparas-NL) sometidas a tratamientos de superovulación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4 y Figura 12.

Tabla 4. Efecto del origen y estado del embrión sobre la tasa de desarrollo embrionario en cultivo *in vitro*.

Resultados del desarrollo a blastocisto y blastocisto expandido

Factor	Variable	N	Blastocisto (%)	Blastocisto expandido (%)
Origen embrión	ML	141	84 ± 3.2	14 ± 2.9 b
	NL	117	91 ± 2.7	31 ± 4.3 a
Estado embrión	C	124	93 ± 2.3 ^a	23 ± 4
	V	134	81 ± 3.5 ^b	20 ± 3.5
Total		258	88 ± 2.2	21% ± 2.7

N: número de embriones transferidos para esa variable

ML: embriones procedentes de hembras múltiparas

NL: embriones procedentes de hembras nulíparas

F: embriones frescos

V: embriones vitrificados

Los datos de muestra se muestran como *lms ± es*: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar

a,b: Valores en las columnas con diferente superíndice que difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

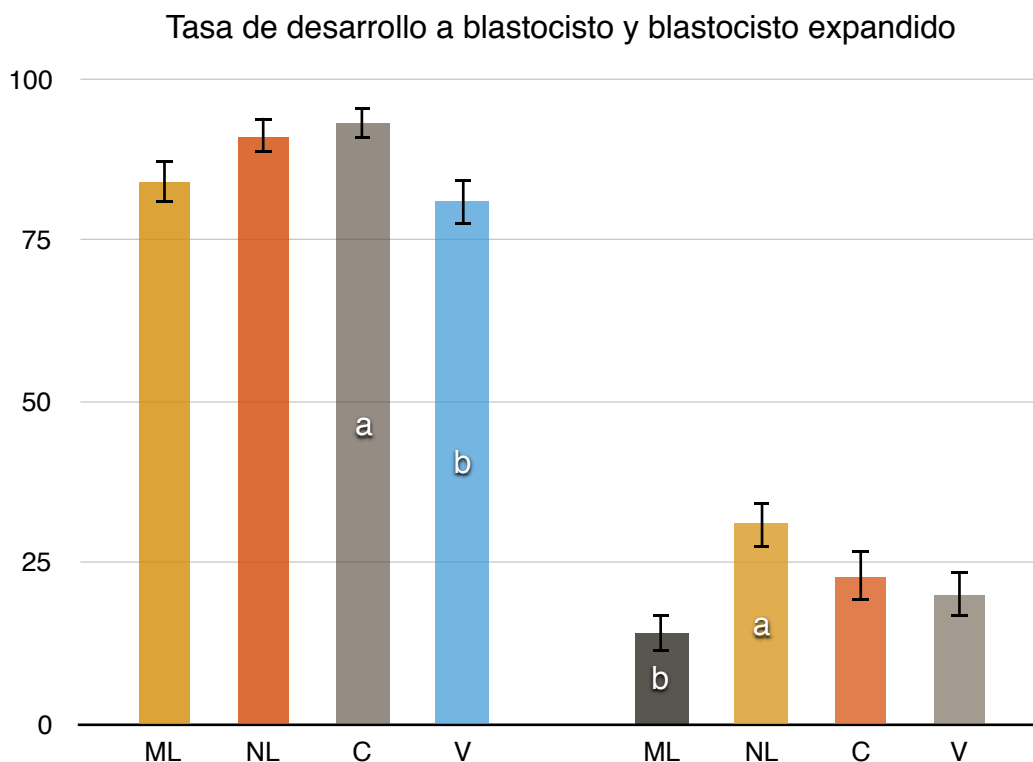


Figura 12. Tasa de desarrollo embrionario *in vitro* hasta blastocisto y blastocisto expandido obtenida para los factores procedencia del embrión (múltiparas-ML y nulíparas-NL) y tipo de embrión (control-C y vitrificado-V).

Los resultados obtenidos muestran un desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto del $88 \pm 2.2\%$ (222 embriones, Tabla 4), mientras que solamente 57 de los mismos ($21 \pm 2.7\%$) alcanzaron el estadio de blastocisto expandido (Tabla 4). En términos de desarrollo a blastocisto, los resultados son superiores o similares a los obtenidos por otros autores tanto con embriones control (no crioconservados) como crioconservados. Maurer *et al.*, 1968; Renard *et al.*, 1982; Carney and Foote, 1990; Viudes de Castro *et al.*, 2015.

Mientras que el desarrollo hasta blastocisto sí fue afectado significativamente por la vitrificación, $93 \pm 2.3\%$ frente a $81 \pm 3.5\%$ (Tabla 4), este factor no resultó significativo en cuanto a su desarrollo hasta blastocisto expandido, con unas tasas de desarrollo de 23 ± 4 y 20 ± 3.5 , respectivamente (Tabla 4). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Gamal *et al.* (2005), donde obtuvieron unas tasas de desarrollo a blastocisto en embriones procedentes de tratamientos con FSH de 46.7% en vitrificados frente a un 83.6% en los controles.

La procedencia de embriones según el tipo de hembra sí que fue significativa sobre la tasa de expansión de los embriones, el $31 \pm 4.3\%$ de los embriones procedentes de nulíparas consiguieron alcanzar el estadio de blastocisto expandido, mientras que únicamente el $14 \pm 2.9\%$ de los procedentes de múltiparas llegaron a ese estadio, sugiriendo una mayor viabilidad embrionaria de los tratamientos de estimulación ovárica por parte de las hembras nulíparas, la cual no fue demostrada con los resultados obtenidos en la viabilidad *in vivo*.

La interacción entre el origen y el estado de los embriones también fue significativa en la tasa de blastocistos expandidos. Cuando los embriones cultivados proceden de múltiparas, sean o no vitrificados, muestran tasas de expansión menores que los controles procedentes de conejas nulíparas ($23 \pm 5.5\%$ frente a $40 \pm 6.5\%$). En la Tabla 6 y Figuras 17 y 18 se pueden observar los resultados obtenidos de la interacción.

Tabla 5. Resultados de la interacción de los factores origen y tipo de embrión en la tasa de desarrollo embrionario hasta blastocisto expandido.

Tasa de desarrollo hasta blastocisto expandido	
Interacción	blastocisto expandido (%)
ML-C	10 ± 3.7^b
ML-V	18 ± 4.4^b
NL-C	40 ± 6.5^a
NL-V	$23 \pm 5.5^{a,b}$

ML-C: embriones control procedentes de hembras múltiparas

ML-V: embriones vitrificado procedentes de hembras múltiparas

NL-C: embriones control procedentes de hembras nulíparas

NL-V: embriones vitrificados procedentes de hembras nulíparas

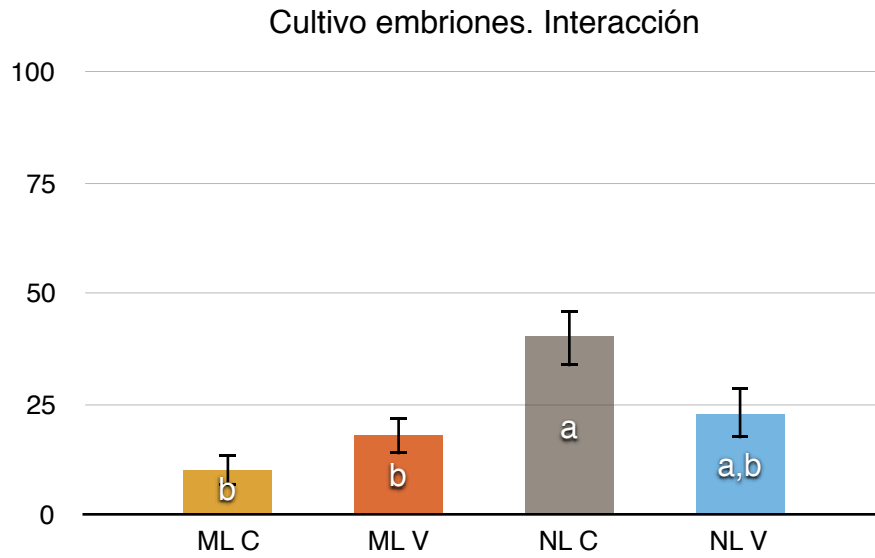


Figura 13. Tasa de desarrollo embrionario hasta blastocisto expandido obtenida por la interacción de los factores procedencia (multíparas-ML y nulíparas-NL) y tipo de embrión (control-C y vitrificado-V)

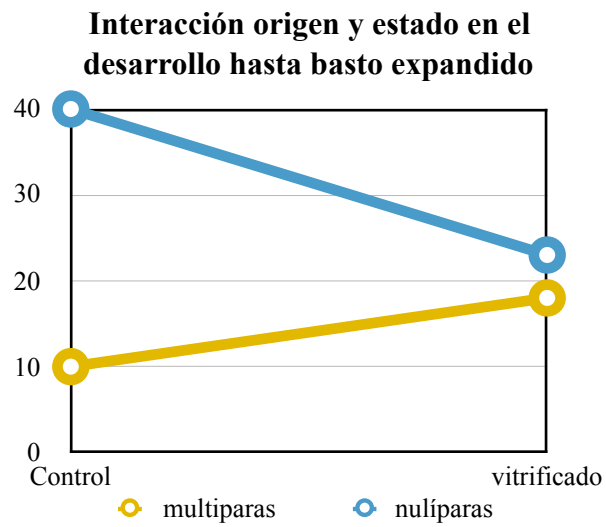


Figura 14. Tendencias del desarrollo embrionario de la interacción entre el origen (multíparas y nulíparas) y el tipo del embrión (control y vitrificado).

4.3 Efectos de las técnicas de superovulación y crioconservación sobre el desarrollo *in vivo*

Un total de 208 embriones recuperados fueron transferidos a 17 hembras receptoras, con objetivo de valorar la viabilidad de los embriones vitrificados o no vitrificados (control) generados por ambos grupos de conejas (múltiparas-ML y nulíparas-NL) sometidas a tratamientos de superovulación. En la Tabla 6 y Figura 18 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 6: Efecto del tipo y origen de los embriones sobre la tasa de supervivencia en transferencias *in vivo*.

Tasa de supervivencia en las transferencias *in vivo*

Factor	Variable	N	Tasa de supervivencia (%)
Origen embriones	ML	98	38 ± 5
	NL	110	45 ± 5
Estado embriones	C	93	56 ± 5.2 ^a
	V	115	29 ± 4.2 ^b
Total		208	42 ± 3.5

N: número de embriones transferidos para esa variable

ML: embriones procedentes de hembras múltiparas

NL: embriones procedentes de hembras nulíparas

C: embriones control

V: embriones vitrificados

Los datos se muestran como *lms ± es*: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar

a,b: Valores en las columnas con diferente superíndice que difieren estadísticamente ($P < 0.05$)

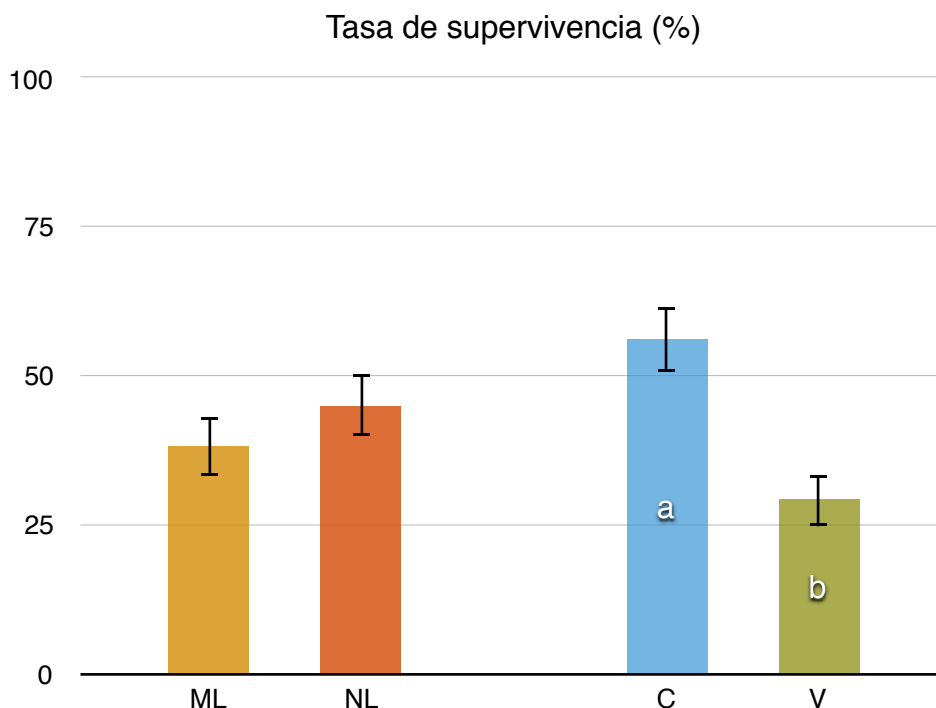


Figura 15. Tasa de supervivencia de embriones en transferencias *in vivo* para los factores de origen (multíparas-ML y nulíparas-NL) y tipo de embrión (vitrificado y control).

De los 208 embriones transferidos se obtuvo una supervivencia total de $42 \pm 3.5\%$. Las tasas de supervivencia mostraron una diferencia significativa entre los embriones vitrificados y los controles, $29\% \pm 4.2\%$ frente a $56 \pm 5.2\%$ respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Renard *et al.* (1982) donde describió una supervivencia del 27.7% en embriones congelados frente a un 38.5 de los controles; así como a los descritos por Kauffman *et al.* (1998), Mehaisen *et al.* (2005), Viude-de-Castro *et al.* (2009), quienes establecieron unas tasas de supervivencia del 25-65% para embriones vitrificados frente a un 50-70% en embriones control, ambos procedentes de tratamientos de superovulación. Por otra parte, el origen de los embriones no afectó significativamente al total de nacidos vivos, obteniéndose una supervivencia del $38 \pm 5\%$ en multíparas y del $45 \pm 5\%$ en nulíparas; lo cual contradice la hipótesis sobre la menor viabilidad de los embriones procedentes de multíparas.

La interacción entre los dos factores no resultó significativa estadísticamente ($p = 0.068$), aunque este valor puede ser debido al tamaño muestral del experimento y debe ser tenido en cuenta en próximos estudios.

5

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

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

- ✓ El estado reproductivo de la hembra afecta significativamente a la respuesta al tratamiento de estimulación ovárica, siendo las nulíparas las que mayor tasa de ovulación presentan, además de generar mayor porcentaje de embriones normales.
- ✓ La repetición del tratamiento no afecta negativamente a la respuesta del tratamiento.
- ✓ Los embriones de hembras multíparas presentan menores tasas de desarrollo hasta blastocisto expandido, pero no afecta significativamente al número de nacidos vivos en transferencias *in vivo*.
- ✓ Los embriones vitrificados presentan tanto una menor viabilidad *in vitro* en términos de tasa de blastocistos como *in vivo* en las tasa de nacidos sobre embrión transferido.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECCHI, E.; CARABATSO, M.J., 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 121(5): 647-653.
- AGGARWAL, B.B.; FARMER, S.W.; PAPKOFF, H.; SEIDEL, G.E., Jr., 1980. Biochemical properties of equine chorionic gonadotrophin from two different pools of pregnant mare sera. *Biol Reprod*, 23(3): 570-576.
- BADAWY A.Y. et al., 2016. Effect of Increased Ovulation Rate on Embryo and Foetal Survival as a Model for Selection by Ovulation Rate in Rabbits. *World Rabbit Science*, 24: 1–8.
- BAGUISI, A.; LONERGAN, P.; OVERSTROM, E.; BOLAND, M., 1999. Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. *Theriogenology*, 55: 665-670.
- BAKKER J. y BAUM, M.J., 2000. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(3): 220–262.
- BALEN, A.H. et al., 2004. Pharmacodynamics of a single low dose of long-acting recombinant follicle-stimulating hormone (FSH-carboxy terminal peptide, corifollitropin alfa) in women with World Health Organization group II anovulatory infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(12): 6297–6304.
- BANK, H. y MAURER, R.R., 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Experimental Cell Research*, 89(1): 188–196. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482774902018>.
- BESENFELDER, U., 1991. *Untersuchungen zum Einfluß von β -carotin auf Fertilitätsparameter in Embryotransferprogrammen beim Kaninchen*. Thesis, Munich, Germany. 145pp.
- BESENFELDER, U.; SOLTI, L.; SEREGI, J.; BREM, G., 1993. Influence of b-carotene on the fertility in rabbits when using embryo transfer programs. *Theriogenology*, 39: 1093–1109.
- BESENFELDER, U.; STROUGHAL, C.; BREM, G., 1998. A method for endoscopic embryo collection and transfer in the rabbit. *J Vet Med A*, 45: 577–579.
- BESENFELDER, U.; THEAU-CLÉMENT, M.; MOSSLACHER, G., 2002. The effect of light intensity and hormonal treatments to induce superovulation on embryo recovery programs in rabbits. In *Joint Meeting Ispra*, 14 pp.
- BOLET, G.; BIDANEL, JP.; OLLIVIER, L., 2001. Selection for litter size in pigs. Efficiency of closed and open selection lines. *Gene Set Evol*, 33: 515-528.
- BROWING, J.; REYES, L. y WOLF, R., 1980. Comparison Evidence of Serum Progesterone , in Pregnant Rabbits : Recognition of Pregnancyi and Estradiol-1713 and Pseudopregnant for Postimplantation rate. *Biology of reproduction*, 23: 1014–1019.
- CAMPBELL, R.K., 2005. Molecular pharmacology of gonadotropins. *Endocrine*, 26(3): 291–6. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-24644472873&partnerID=tZOtx3y1>.

- CARNEY, E.W. y FOOTE, R.H., 1990. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos *in vivo* and *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*, 89(2): 543–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2401982>.
- CHEN, S.U.; LIEN, Y.R.; CHAO, K.H.; HO, H.N.; YANG, Y.S.; LEE, T.Y., 2003. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing. *Mol Cell Endocrinol*, 202: 101-107.
- CHENG, H.; DOOLEY, M.P.; HOPKINS, S.M.; ANDERSON, L.L.; YIBCHOK-ANUN, S.; HSU, W.H., 1999. Development of rabbit embryos during a 96-h period of *in vitro* culture after superovulatory treatment under conditions of elevated ambient temperature. *Anim Reprod Sci*, 56(3-4): 279-290.
- CHRENEK, P.; MAKAREVICH, A.; VASICEK, D.; LAURINCIK, J.; BULLA, J.; GAJARSKA, T.; RAFAY, J., 1998. Effects of superovulation, culture and microinjection on development of rabbit embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 50(4): 659-666.
- CORTELL, C.; VICENTE, J.S.; MOCÉ, E.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P., 2010. Efficiency of Repeated *In vivo* Oocyte and Embryo Recovery After rhFSH Treatment in Rabbits. *Reprod Dom Anim*, 45(1): 155–159.
- CORTELL, C., 2012. Efecto de la aplicación de gonadotropinas recombinantes humanas sobre la producción y la calidad de los ovocitos y embriones de coneja. *Tesis Doctoral en Ciencia Animal*. Universitat Politècnica de València. 195 pp.
- CORTELL, C. et al., 2015. Effect of different superovulation stimulation protocols on adenosine triphosphate concentration in rabbit oocytes. *Zygote*, 23(4): 507–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735658> [Accedido 4 Febrero, 2017].
- DEVROEY, P. et al., 2009. A double-blind, non-inferiority RCT comparing corifollitropin alfa and recombinant FSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. *Human Reproduction*, 24(12): 3063–3072.
- DOBRINSKY, JR., 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45: 17-26.
- DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; MUNSON, L.; BROWN, J.; WILDT, D.E., 1992. Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol Reprod*, 46(5): 972-980.
- DRION, P.V.; De ROOVER, R.; HOUTAIN, J.; McNAMARA, E.M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J., 2001. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. *Reprod Nutr Dev*, 41: 207-215.
- FAHY, G.M.; WOWK, B.; WU, J.; PAYNTER, S., 2004. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*, 48: 22-35.
- FAUSER, B.C.; MANNAERTS, B.M.; DEVROEY, P.; LEADER, A.; BOIME, I.; BAIRD, D.T., 2009. Advances in recombinant ADN technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum Reprod Update*, 15(3): 309–321.

- FECHEIMER, N.S. y BEATTY, R.A., 1974. Chromosomal abnormalities and sex ratio in rabbit blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility*, 37: 331–341.
- FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIEBAHN, C.; NAVARRETE-SANTOS, A.; DURANTHON, V., 2012. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1): 1-10.
- FUJIMOTO, S.; PAHLAVAN, N.; DUKELOW, W.R., 1974. Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J Reprod Fertil*, 40(1): 177-181.
- GAMAL, M. et al., 2005. Embryo cryopreservation program in a rabbit line selected by growth rate: Superovulation and *in vivo* embryo recovery protocols. *Ph. D. Thesis*, Universidad Politécnica de Valencia, España. 139 pp. [Accedido 12 Enero, 2017]
- GARCÍA, M.L., 2000a. Reconstitución de una línea de conejos a partir de embriones crioconservados. *Arch Zootec*, 49: 81-86. 45
- GARCÍA, M.L., 2000b. Vitrified embryos transfer of two selected spanish rabbit lines to Uruguay. *7th World Rabbit Congress, Universidad Politécnica de Valencia, Spain, Vol. A*, pp. 139-142.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, F.; VICENTE J.S., 1990. Effect of PMSG treatment to mating interval on the superovulatory response of primiparous rabbits. *J Appl Rabbit Res*, 13: 71-73.
- GARDE LÓPEZ, J.J.; GALLEGO MARTINEZ, L., 1996. *Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal*. Universidad de Castilla La Mancha. España. 246 pp.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G., 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14(2): 159-177.
- GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M.J.; LÓPEZ- SEBASTIÁN, A., 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, 54(7): 1055-1064.
- GOSSELIN, N. et al., 2000. Decreased LH pulsatility during initiation of gonadotropin superovulation treatment in the cow: Evidence for negative feedback other than estradiol and progesterone. *Theriogenology*, 54(4): 507–521.
- GOUGEON, A., 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17(2): 121–155.
- GREVE, T.; CALLENSSEN, H., 2001. Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod Nutr Dev*, 41(5): 451-459.
- GUZICK, D.S.; ANN, S.; COUTIFARIS, C.; OVERSTREET, J.W.; FACTOR-LITVAK, P.; SEINKAMPF, M.P.; HILL, J.A.; MASTROIANNI, L.; BUSTER, J.E.; NAKAJIMA, S.T.; VOGEL, D.L.; CANFIELD, R.E., 1999. Efficacy of Superovulation and Intrauterine Insemination in the Treatment of Infertility. *The New England Journal of Medicine*, 340(3): 177-183.
- HAFEZ, E.S.E., 1969. Fetal survival in undercrowded and overcrowded unilaterally pregnant uteri in the rabbit. *In Proc.: 6th International Congress Reproduction Animal*, 22-26 July, 1969. Paris, France. 1, pp.575

- HAFEZ, SE., 2000. Preservation and cryopreservation of Gametes and Embryos. In: *Reproduction in Farm Animals*, Hafez B/Hafez ESE (ed.), Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp. 431-442.
- HARCOUT-BROWN, F., 2002. Textbook of Rabbit Medicine. *Elsevier Health Sciences*, 3(3): 356-360.
- HASHIMOTO, S.; KURAMOCHI, T.; AOYAGI, K.; TAKAHASHI, R.; UEDA, M.; HIRAO, M.; KAMEI, M.; KITADA, K.; HIRASAWA, K., 2004. Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation treatment. *Exp Anim*, 53(4): 395-397.
- HATOUM, H.T.; KEYE, W.R.; MARRS, R.P.; WALTON, S.M.; MARSHAL, D.C., 2005. A Markov model of the cost-effectiveness of human-derived follicle-stimulating hormone (FSH) versus recombinant FSH using comparative clinical trial data. *Fertil steril*, 83(3): 804-807.
- HERREROS, A., 2014. Efecto de las gonadotropinas recombinantes humanas rhFSH y rhLH sobre el desarrollo embrionario en conejo. *Trabajo Fin de Grado en Biotecnología*. Universitat Politècnica de València. 39 pp.
- HESSER, M.W.; MORRIS J.C.; GIBBONS J.R., 2011. Advances in Recombinant Gonadotropin Production for Use in Bovine Superovulation. *Reprod Domest Anim*, 46(5): 933-942.
- HOFFMAN, L.H. et al., 1998. Progesterone and Implanting Blastocysts Regulate Muc1 Expression in Rabbit Uterine Epithelium. *Endocrinology*, 139(1): 266–271. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/endo.139.1.5750>.
- JOLY, T. 1996. Cryopreservation of genetic resources in rabbit species: practical application. *6th World Rabbit Congress, Toulouse 2*, pp. 293-298.
- JOLY, T., 1997. Etablissement d'une cryobanque de semences ou d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez les mammifères domestiques: l'exemple du lapin (*Oryctolagus cuniculus*). *Thèse nouveau doctorat*. Institut national des sciences appliquées de Lyon. 143 pp. *Reproduction*, 130(6): 813-823.
- JONES, K.T., 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*, 130(6): 813-823.
- KANAYAMA, K.; ENDO, T.; SAKUMA, Y., 1992. Simplification of superovulation induction in rabbits by means of human menopausal gonadotrophin dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Zentralbl Veterinarmed A*, 39(10): 798–800.
- KANAYAMA, K. et al., 1994. Simplification of superovulation induction by using polyvinylpyrrolidone as a solvent for FSH in rabbits. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 56(3), pp.599–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7948403> [Accedido 12 Enero, 2017].
- KASAI, M., 1995. Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. *Methods Mol Biol*, 38: 211-219.

- 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. *J Reprod Fertil*, 89: 91-97.
- KAUFFMAN, R.D.; SCHMIDT, P.M.; RALL, W.F.; HOEG, J.M., 1998. Superovulation of rabbits with FSH alters *in vivo* development of vitrified morulae. *Theriogenology*, 50(7): 1081-1092.
- KAVOUSSI, S.K., 2013. Impact of superovulation for women with endometriosis. *Semin Reprod Med*, 31(2): 150-153.
- KENNELLY, J.J.; FOOTE, R.H., 1965. Superovulatory Response of Pre- and Post-Pubertal Rabbits to Commercially Available Gonadotrophins. *J Reprod Fertil*, 9: 177-188.
- KIM, J.K. et al., 1988. Studies on simplified procedures for freezing and thawing of bovine embryos. Part I. Effects of PMSG and hCG injection on the induction of superovulation in rabbit. *Korean J. Anim. Sci.* 30: 519-524.
- KOBAYASHI, K.; NAGASHIMA, H.; YAMAKAWA, H.; KATO, Y.; OGAWA, S., 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. *Theriogenology*, 33: 777-788.
- KOJIMA, T.; HASHIMOTO, K.; ITO, S.; HORI, Y.; TOMIZUKA, T.; OGURI, N., 1990. Protection of rabbit embryos against fracture damage from freezing and thawing by encapsulation in calcium alginate gel. *J Exp Zool*, 254: 186-191.
- KOJIMA, T.; SOMA, T.; OGURI, N., 1985. Effect of rapid addition and dilution of dimethyl sulfoxide on the viability of frozen-thawed rabbit morulae. *Cryobiology*, 22: 409-416.
- LAVARA, R.; BASELGA, M. y VICENTE, J.S., 2011. Does storage time in LN2 influence survival and pregnancy outcome of vitrified rabbit embryos? *Theriogenology*, 76(4): 652-657. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.018>.
- LEAO, R. y ESTEVES, S., 2014. Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics*, 69(4): 279-293. Available at: <http://www.scopus.com/inward/reco?eid=2-s2.0-84898744189&partnerID=tZOtx3y1>. [Accedido 12 Enero, 2017]
- LEE, K.Y. y DEMAYO, F.J., 2004. Animal models of implantation. *Reproduction*, 128(6): 679-695.
- LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.; LEDDA, S.; NAITANA, S., 2001. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower *in vitro* viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod Nutr Dev*, 41(3): 239-246.
- LOPES DA COSTA, L.; CHAGAS E SILVA, J.; ROBALO SILVA, J., 2001. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*, 56(1): 65-77.
- LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F.; CAMON, J.; RUTLAND, J.; LABERNIA, J., 1994. Development *in vitro* of rabbit embryos after freezing by two-step or ultrarapid cooling methods. *J Vet Med A*, 41: 780-790.
- LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F., 2000. *In vitro* and *in vivo* survival of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 53: 259.

- MAERTENS, L.; LUZI, F., 1995. Effect of diluent and storage time of rabbit semen on the fertility of does reared under two different lighting schedule. *World Rabbit Science*, 3(1): 27-34.
- MARCO, F.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; BALASCH S.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P., 2010. Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Repro Domest Anim*, 45(5): 118-123.
- MARCO-JIMÉNEZ, F. et al., 2013. In vivo development of vitrified rabbit embryos: Effects of vitrification device, recipient genotype, and asynchrony. *Theriogenology*, 79(7): 1124–1129.
- MAURER, R.R.; HUNT, W.L.; FOOTE, R.H., 1968. Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in Dutch-belted rabbits. *J Reprod Fertil*, 15(1): 93- 103.
- MAURER, R.R.; HASEMANN, JK., 1976. Freezing morula stage rabbit embryos. *Biol Reprod*, 14: 256-263.
- MEHAISEN, G.M.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P., 2005. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and *in vitro* development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci*, 90(1-2): 175- 184.
- MEHAISEN, G.M.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R., 2006. *In vitro* and *in vivo* viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*, 65(7): 1279-1291.
- MEHLMANN, L.M., 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130(6): 791- 799.
- MERMILLOD, P.; OUSSAID, B. AND COGNIE, Y., 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, 54: 449-460.
- MORELL, A.G.; GREGORIADIS, G.; SCHEINBERG, I.H.; HICKMAN, J.; ASHWELL, G., 1971. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem*, 246(5): 1461–1467.
- MOUNOLOU, JC.; QUENEY, G.; DENNEBOUY, N.; MONNERO, M., 2003. Integrative biology and genetic resources management. *Integrative and Comparative Biology*, 43: 271-275.
- OUT, H.J., 2005. Recombinant follicle-stimulating hormone: gold standard or not? *Repro Biomed Online*, 11(5): 536-539.
- PALMA, G.A., 2008. Biotecnología de la Reproducción. *Ed ReproBiotec*. 693 pp.
- PAWSON, A.J.; MCNEILLY, A.S., 2005. The pituitary effects of GnRH. *Animal Reproduction Science*, 88(1-2): 75-94.
- PAUFLER, S.; MAURER, R. y GELDERMANN, H., 1975. Chromosome aberrations in blastocysts from superovulated rabbits inseminated with semen stored up to 5 days at

- different temperatures. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A*, 22(5): 414–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/807064>
- PERLMAN, S.; VAN DEN HAZEL, B.; CHRISTIANSEN, J.; GRAM-NIELSEN, S.; JEPPESEN, C.B.; ANDERSEN, K.V.; HALKIER, T.; OKKELS, S.; SCHAMBYE, H.T., 2003. Glycosylation of an N- terminal extension prolongs the half-life and increases the *in vivo* activity of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(7): 3227–3235.
- PLIEGO, G., 2005. Respuesta ovárica a un estímulo superovulatorio con diferentes niveles de FSH en ovinos pelibuey. *Tesis Profesional en Médico Veterinario Zootecnista*. Universidad Veracruzana. 50 pp.
- RALL, WF.; FAHY, GM, 1985. Ice free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.
- REBOLLAR, P.G.; UBILLA, E.; LORENZO, P.L.; SÁNCHEZ-DÁVIL, M.; SÁNCHEZ, J.; TUCKER, L.; ALVAIÑO, J.M.R., 2000. Ovulation and embryo implantation rate in synchronized artificial inseminated multiparous lactating does. *7th World Rabbit congress*, Universidad Politécnica de Valencia, Vol. A, pp. 239-244.
- RENARD, JP.; BUI-XUAN-NGUYEN, GARNIER, V., 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J Reprod Fertil*, 71: 573-580.
- RENARD, JP.; CARNIER, V.; PARVEX, R., 1982. Production et congélation de l'embryon de lapin. 3es Journées de la Recherche Cunicole en France, Communication n° 18.
- RODRIGUEZ, J.M. y UBILLA, E., 1998. Effect of sexual receptivity on ovulation response in rabbit does induced with GnRH. *4th World Rabbit Congr*, pp. 504–509. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034105151&partnerID=tZOtx3y1>.
- ROSE, M.P.; GAINES DAS, R.E.; BALEN, A.H., 2000. Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev*, 21(1): 5-22.
- SALVETTI, P. et al., 2007. Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67: 1185–1193.
- SALVETTI, P., 2008. Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine: Application à la gestion des ressources génétiques. Tesis Université Claude Bernard, Lyon. 195 pp.
- SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J., 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822: 1896-1912.
- SCHMIDT, P.M.; HOLLIFIELD, V.M.; LIN, X.; WILDT, D.E., 1992. Induced ovulation and adequate embryo recoveries in New Zealand white rabbits treated with a low PMSG/HCG dose or single, daily injections of FSH-P. *Theriogenology*, 37(1): 293.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C., 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1): 126-136.
- SMORAG, Z.; GAJDA, B.; WIIECZOREK, B.; JURA, J., 1989. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31: 1227-1231.

- SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M., 2007. Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci*, 99(1-2): 1-8.
- SWANSON, W.F. et al., 1996. Kinetics of the humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. *American journal of veterinary research*, 57(3): 302–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8669759>.
- TANEJA, M., PAREEK, P.K. y JATKAR, P.R., 1990. Superovulation and embryo recovery in rabbits 52 (*Oryctolagus cuniculus*) using different doses of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG). *Indian journal of experimental biology*, 28(11): 1031–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2283171>
- TAO, T. y NIEMANN, H., 2000. Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(4): 881–889. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10739837>.
- TECHAKUMPHU, M.; HEYMAN, Y., 1987. Survival of frozen-thawed rabbit morulae after synchronous or asynchronous transfer. *Anim Reprod Sci*, 12: 305-312.
- THEAU-CLÉMENT, M. et al., 2005. Recommendations and guidelines for applied reproduction trials with rabbit does. *World Rabbit Science*, 13(3): 147–164.
- THEAU-CLÉMENT, M.; LEBAS, F.; POUJARDIEU, B.; MERCIER, P., 1998. Effet de différentes doses de PMSG sur l'induction de la réceptivité sexuelle et la productivité des lapines conduites en insémination artificielle. 7es Journées de la Recherche Cunicole en France, pp. 221-224.
- TILLY, J.L.; KOWALSKI, K.I.; JOHNSON, A.L.; HSUEH, A.J., 1991. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129(5): 2799-2801.
- TOSTI, E., 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol*, 4: 26.
- TROUSDALE, R.K.; YU, B.; POLLAK, S.V.; HUSAMI, N.; VIDALI, A.; LUSTBADER, J.W., 2009. Efficacy of native and hyperglycosylated follicle-stimulating hormone analogs for promoting fertility in female mice. *Fertil Steril*, 91(1): 265–270.
- TSUNODA, Y.; SHIMOHORA, Y.; IZUMI, K.; SOMA, T.; SUGIE, T., 1979. The survival of rabbit eggs stored in liquid nitrogen at different developing stages. Japan. *J Anim Reprod*, 25: 189- 193.
- TSUNODA, Y.; SUGIE, T., 1977. Effect of the freezing medium on the survival of rabbit eggs after deep freezing. *J Reprod Fertil*, 50: 123-124.
- VAN DE WEIJER, B.H.; MULDER, J.W.; BOS ES VERHAERT, P.D.; VAN DEN HOOVEN, H.W., 2003. Compositional analyses of a human menopausal gonadotrophin preparation extracted from urine (menotropin). Identification of some of its major impurities. *Repro BioMed Online*, 7(5): 547-557.
- VERBOST, P. et al., 2011. Pharmacologic profiling of corifollitropin alfa, the first developed sustained follicle stimulant. *European Journal of Pharmacology*, 651(1-3): 227–233.

- VICENTE, JS.; GARCÍA-JIMÉNEZ, F., 1991. Effects of hCG treatment on morula recovery in the rabbit and their survival after synchronous transfer. *Anim Reprod Sci*, 24: 347– 353.
- VICENTE, JS.; GARCÍA-JIMÉNEZ, F., 1994. Osmotic and cryoprotective effects of 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(6): 1120-1125.
- VICENTE, J.S.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. y GARCÍA, M.L., 1999. In vivo survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein. *Reproduction, nutrition, development*, 39(5-6): 657–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619172>. [Accedido 4 Febrero, 2017]
- VICENTE, JS.; VIUDES-DE-CASTRO, MP.; GARCÍA, ML.; BASELGA, M., 2003. Effect of rabbit line on a program of cryopreserved embryos by vitrification. *Reprod Nutr Dev*, 43: 137–143.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; CORTELL, C.; MOCÉ, E.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; JOLY, T.; VICENTE, J.S., 2009. Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology*, 72(5): 655–662.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; CORTELL, C.; VICENTE, JS., 2010. Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. *Theriogenology*, 74: 1623-1628.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P. et al., 2015. Effect of luteinizing hormone on rabbit ovarian superstimulation and embryo developmental potential. *Theriogenology*, 84(3): 446–451. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15001806>. [Accedido 6 Febrero, 2017]
- WHITTINGHAM, DG.; LEIBO, SP.; MAZUR, P., 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and 269°C. *Science*, 178: 411-414.
- ZELEZNIK, A.J., 2004. Dynamics of primate follicular growth: a physiological perspective. *The Ovary*, 2: 45–53.