

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

Efecto de la crioconservación sobre el proteoma de hígado en conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Trabajo fin de grado en Biotecnología

ALUMNA: Sara Borrás Pérez

TUTOR: David Sánchez Peñaranda

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Guillem Estruch Cucarella

Curso académico: 2016-2017

VALENCIA, Julio de 2017



RESUMEN, RESUM

Y ABSTRACT

Datos personales y del trabajo de fin de grado**Nombre y apellidos:** Sara Borrás Pérez**Título del TFG:** Efecto de la crioconservación sobre el proteoma de hígado en conejo (*Oryctolagus cuniculus*).**Lugar de realización:** Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA)**Titulación:** Biotecnología**Intensificación:** Animal y humana**Tutor académico:** David Sánchez Peñaranda**Director experimental:** Guillem Estruch Cucarella**Fecha de lectura:** Julio de 2017**Resumen**

Conservar y mantener gametos y embriones, así como tejido reproductivo, es una herramienta cada vez más utilizada en el área de la reproducción asistida, siendo concretamente la embrionaria en fases tempranas la opción más extendida. Sin embargo, en estudios con diferentes modelos animales se ha podido detectar que la manipulación embrionaria conlleva alteraciones durante el desarrollo del embrión.

El principal objetivo de este estudio es determinar si el proceso de criopreservación embrionaria temprana induce modificaciones en el proteoma del hígado de un individuo adulto y, en caso afirmativo, si estas modificaciones son heredadas por su descendencia. Para ello, el proteoma de muestras hepáticas de individuos adultos fue analizado mediante un ensayo proteómico “bottom-up” basado en LC-MS/MS. Se utilizaron 4 grupos experimentales correspondientes con animales nacidos después de haber sido sometidos a la crioconservación en estado de embrión (VF1) o no (grupo control, F1) y a la descendencia de ambos grupos (VF2, animales nacidos de animales crioconservados VF1 y F2 animales nacidos de los animales control F1). Con los espectros obtenidos, mediante herramientas informáticas, se identificaron y cuantificaron las proteínas detectadas, y con el posterior análisis de la varianza se determinaron las que se encontraban diferencialmente expresadas entre los grupos definidos. Por último, se realizó un análisis funcional para determinar qué procesos biológicos y funciones se alteraron como consecuencia de la criopreservación. Los resultados demuestran que el proceso de criopreservación embrionaria podría estar modificando los procesos relacionados con el estrés oxidativo (procesos REDOX) tanto en los individuos sometidos a crioconservación como a su descendencia.

Palabras clave

Criopreservación, conejo, vitrificación, hígado, proteoma

Dades personals i del treball de fi de grau

Nom i cognoms: Sara Borrás Pérez

Títol del TFG: Efecte de la criopreservació sobre el proteoma hepàtic del fetsge en conill (*Oryctolagus cuniculus*).

Lloc de realització: Institut de Ciència y Tecnologia Animal (ICTA)

Titulació: Biotecnologia

Intensificació: Animal i humana

Tutor acadèmic: David Sánchez Peñaranda

Director experimental: Guillem Estruch Cucarella

Data de lectura: Juliol de 2017

Resum

Conservar i mantindre gàmetes i embrions, així com teixit reproductiu, és una ferramenta cada vegada més utilitzada en l'àrea de la reproducció assistida, sent concretament l'embrionària en fases primerenques l'opció més estesa. No obstant això, en estudis amb diferents models animals s'ha pogut detectar que la manipulació embrionària comporta alteracions durant el desenrotllament de l'embrió.

El principal objectiu d'este estudi és determinar si el procés de criopreservació embrionària primerenca induïx modificacions en el proteoma del fetsge d'un individu adult i, en cas afirmatiu, si estes modificacions són heretades per la seua descendència. Per a això, el proteoma de mostres hepàtiques d'individus adults va ser analitzat per mitjà d'un assaig proteòmic "bottom-up" basat en LC-MS/MS. Es van utilitzar 4 grups experimentals corresponents amb animals nascuts després d'haver sigut sotmesos a la crioconservació en estat d'embrió (VF1) o no (grup control, F1) i a la descendència d'ambdós grups (VF2, animals nascuts d'animals crioconservados VF1 i F2 animals nascuts dels animals control F1) . Amb els espectres obtinguts, per mitjà de ferramentes informàtiques, es van identificar i van quantificar les proteïnes detectades, i amb la posterior anàlisi de la varianza es van determinar les que es trobaven diferencialment expressades entre els grups definits. Finalment, es va realitzar una anàlisi funcional per a determinar quins processos biològics i funcions es van alterar com a conseqüència de la criopreservació. Els resultats demostren que el procés de criopreservació embrionària podria estar modificant els processos relacionats amb l'estrés oxidatiu (processos REDOX) tant en els individus sotmesos a crioconservació com a la seua descendència

Paraules clau

Criopreservació, conill, vitrificació, proteoma

Information about the autor and the TFG

Name and surname: Sara Borrás Pérez

Title of TFG: Effect of cryopreservation process on liver proteome in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).

Place of performance: Institute of Animal Science and Technology (ICTA)

Degree: Biotechnology

Intensification: Animal and human biotechnology

Academic tutor: David Sánchez Peñaranda

Experimental director: Guillem Estruch Cucarella

Reading date: July 2017

Abstract

Keeping and preserving gametes and embryos, as well as reproductive tissue, is a tool each time more used on the assisted reproduction area, being concretely the cryopreservation of early embryos the most extended one. Nevertheless, in studies made with different animal models, it has been able to detect that embryonic manipulation involves alterations during the embryonic development.

The main objective of this study is to determine if the process of early embryo cryopreservation causes modifications on the kidney's proteome of an adult and, if it does, if this modifications are inherited by its progeny. To that end, the proteome of different liver samples of adult individuals were analyzed by a proteomic "bottom-up" assay based on LC-MS/MS. Four experimental groups corresponded with animals born after have being subjected to cryopreservation in embryonic state (VF1) or not (control group, F1) and the offspring of both groups (VF2, animals born of cryopreserved animals VF1 and F2 animals born of the control group F1) were used. With the spectres obtained, using computer tools, were identified and quantified the proteins detected, and, with the later analysis of the variance were determined the ones that were differentially expressed among defined groups. To end up, a functional analysis was done, to determine which biological processes and functions were altered as a consequence of cryopreservation. The results show that the embryonic cryopreservation process could be modifying process and functions related with the oxidative stress (REDOX processes) both in individuals undergoing cryopreservation as to their offspring.

Key words

Cryopreservation, rabbit, vitrification, liver, proteome

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, en el que estoy a punto de finalizar una etapa clave en mi vida, me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible estos cuatro años.

En primer lugar, quiero agradecerle a Paco el haberme dado la oportunidad de trabajar con él, no sólo durante este proyecto, sino también los años anteriores. Con él he podido descubrir cómo es la vida de un investigador, y también, aunque parezca imposible por el gran esfuerzo que supone, cómo disfrutarla. Me ha transmitido un espíritu de superación que no tenía, y eso es de agradecer. Y, aunque durante el desarrollo de este proyecto no ha podido estar presente, desde lejos ha sabido motivarme en los momentos que más lo necesitaba.

No puedo hablar de este proyecto sin mencionar a David y Guillem, mi tutor y director. Ellos han estado conmigo desde el inicio de esta aventura, guiándome, apoyándome y transmitiéndome todos los conocimientos que me han permitido llegar hasta aquí. Muchas gracias por haberme aguantado estos meses, por haberme enseñado, y, como siempre os digo, por todo. Ha sido gratificante poder compartir esta experiencia con vosotros y, de hecho, estoy segura que sin vuestra ayuda no hubiese sido lo mismo.

Por supuesto, quiero mencionar a todos los compañeros con los que he coincidido en el laboratorio. Desde el primer día que trabajé con ellos me hicieron sentir como en casa, como una más. Gracias a ellos, de mi paso por el laboratorio obtuve tanto conocimientos como buenas amistades. Por ello, muchas gracias a José, Luis, Ximo, Jesús, Carmen, Amparo, Estrella, Alba, Jorge.

Aunque no he tenido la oportunidad de trabajar codo con codo con el resto de profesores que nos han ido formando durante estos cuatro cursos, quiero agradecerles su dedicación y su esfuerzo por transmitirnos todos sus conocimientos. Gracias a ello hoy, todos mis compañeros de la promoción y yo, no abandonamos la universidad de vacío.

Cuatro años son muchos años. Muchos momentos, muchas horas de clase, de biblioteca, de fiesta, de risas y lágrimas. Muchas cosas buenas, y también malas. Pero todas ellas han sido maravillosas gracias a Andrea, Irene, Rocío, María, Marta, Judith, Arantxa, Filo, Joanvi, Ivan, Josema, Enric, Arnau, Victor. Mis amigos, mi OHANA. Llegaron los últimos a mi vida, pero ya han ocupado un lugar permanente en ella. Y, aunque ahora termina la etapa que nos unió, sé que esto no termina aquí. Gracias chicos por estos años y por los que quedan, siempre tendré algo que agradeceros. No cambiéis nunca.

Fuera del ambiente la universidad, siempre he tenido a gente apoyándome. Todas mis amigas del pueblucho de cabras en el que todos creen que vivo (Marta C, Marta P, Mapi, Aida, Alba, Sara D, Maite, María, Raquel y Blanca) han conseguido sacarme una sonrisa en

AGRADECIMIENTOS

los momentos más difíciles y me han continuado queriendo a pesar de que mi vida social sufrió un ligero bajón hace cuatro años. A mis “amis”, mis bellas y bestias: gracias por todos los momentos vividos y por los que se nos vienen encima.

Desde antes de comenzar este grado, en mi vida ya había una persona muy importante para mí, mi pareja. A Joshua, así como a todos los suyos, tengo mucho que agradecerle. Hemos vivido buenos momentos, aunque también malos. Pero todos ellos me han hecho crecer como persona, haciéndome tal y como soy ahora. Muchas gracias por hacerme crecer, por tus ánimos, tus tonterías, tus risas, tus súper cenas reconfortantes tras horas y horas de estudio, por tus momentos. Gracias simplemente por ser tú y recuerda coger siempre paraguas, porque parece que va a llover.

Para terminar, me gustaría dedicarle unas palabras a mi principal pilar de apoyo: mi familia. Tíos, abuelos, primos, conocidos, amigos de la familia... todos ellos han estado cuidándome y procurando lo mejor para mí desde que llegué al mundo, y por ello en esta etapa siempre han estado ahí. A todos ellos, tengo muchísimo que agradecerles: por los domingos de piscina en el chalet del abuelito, por las comidas o cenas interminables, por las reuniones en “el corral de la Pacheca”, porque nunca han dejado de confiar en mi ni cuando yo lo hacía... Simplemente gracias. De este pilar, como es de esperar, hay una parte que merece una especial atención. Mis padres. De ellos tengo tanto que decir, que no sé muy bien por dónde empezar. Gracias a ellos en ningún momento me he sentido sola porque, literalmente, nunca me han dejado sola. Siempre han estado ahí dándome sus consejos, subiéndome la moral, llenando todos los vacíos que he podido tener, haciéndome la vida lo más fácil posible, queriéndome de una forma incondicional. Mis padres son unos supervivientes, y gracias a que ellos han sido, son y serán siempre mi referencia, sé que yo también conseguiré sobrevivir. Todo lo que he conseguido y conseguiré, siempre se lo voy a deber a ellos. Como ya os he dicho, sois mi referencia, y espero que mis hijos lleguen algún día a sentir, al menos, la mitad de lo que siento yo por vosotros. Así que, literalmente, GRACIAS POR TODO.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	VII
ANGLICISMOS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CRIOPRESERVACIÓN	1
1.1.1 MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN	2
1.1.2 IMPORTANCIA DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA REPRODUCCIÓN	2
1.1.3 EFECTOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN EMBRIONES	3
1.1.4 POR QUÉ EVALUAR EL EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EMBRIONARIA EN EL ANIMAL ADULTO Y SU DESCENDENCIA	3
1.1.5 CÓMO EVALUAR LOS EFECTOS PROVOCADOS POR LA CRIOPRESERVACIÓN	4
1.2 ESTUDIO PROTEÓMICO	5
1.2.1 MÉTODOS PARA REALIZAR UN ESTUDIO PROTEÓMICO	6
1.2.2 ENSAYO BOTTOM-UP LC-MS/MS	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 ANIMALES	10
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	10
3.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	11
3.4. ENSAYO LC-MS/MS	12
3.5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS ARCHIVOS	13
3.5.1 MAXQUANT	13
3.5.2 ANÁLISIS DE LA REPRODUCIBILIDAD	14
3.6. DEPURACIÓN DE LOS ARCHIVOS GENERADOS	14
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
3.7.1 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)	16
3.7.2 HEATMAP Y ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)	16
3.7.3 FOLD-CHANGE (FC) Y T-TEST	16
3.8. ANÁLISIS FUNCIONAL	17
4. RESULTADOS	19
4.1 ENSAYO LC-MS/MS	19
4.1.1. REPRODUCIBILIDAD	19
4.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS ARCHIVOS	19
4.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
4.3 ANÁLISIS FUNCIONAL	23
5. DISCUSIÓN	28
5.1 REPRODUCIBILIDAD DEL ENSAYO	28
5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
5.3 ANÁLISIS FUNCIONAL	29

- EFECTO DEL PASO DE UNA GENERACIÓN A OTRA	30
- EFECTO DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA GENERACIÓN 1	30
- EFECTO TRANSGENERACIONAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA GENERACIÓN 2	31
6. CONCLUSIONES	34
7. REFERENCIAS	35
ANEJOS	41
ANEJO I	42
ANEJO II	45
ANEJO III	51
ANEJO IV	57
ANEJO 5	63

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. EJEMPLAR DE RAZA NEOZELANDESA BLANCA.	1
FIGURA 2. A) ESTADO CRISTALINO GENERADO POR LA CONGELACIÓN DEL FLUIDO Y B) ESTADO VÍTREO GENERADO POR LA VITRIFICACIÓN DEL FLUIDO.	2
FIGURA 3. FLUJO DE TRABAJO SEGUIDO EN UN ENSAYO "BOTTOM-UP" TÍPICO (ARYAL AND SHERMAN 2016).....	8
FIGURA 4. EJEMPLAR DE RAZA CALIFORNIANA (LÍNEA R).....	10
FIGURA 5. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL SEGUIDO	11
FIGURA 6. HÍGADO DE CONEJO A PARTIR DEL CUAL SE REALIZÓ EL ESTUDIO PROTEÓMICO.....	11
FIGURA 7. IMAGEN DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS EMPLEADO EN EL ENSAYO: Q EXACTIVE™ HF HYBRID QUADRUPOLE-ORBITRAP MS, DE THERMO SCIENTIFIC (WALTHAM, MA).	12
FIGURA 8. GRÁFICO DE DISPERSIÓN OBTENIDO A PARTIR DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP) DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA COMPARACIÓN F1 VS F2 VS VF1 VS VF2. LA PRIMERA COMPONENTE PRINCIPAL (CP1; 38,7% DE LA VARIABILIDAD) SEPARA LAS MUESTRAS DEL GRUPO VF2 DEL RESTO DE GRUPOS, Y LA SEGUNDA COMPONENTE PRINCIPAL (CP2; 17,6% DE LA VARIABILIDAD) SEPARA LAS MUESTRAS DE LA GENERACIÓN 1 DE LAS DE LA GENERACIÓN 2.	20
FIGURA 9. HEATMAP OBTENIDO CON EL CLUSTERING DE LAS MUESTRAS DE LA COMPARACIÓN F1 VS F2 VS VF1 VS VF2 EN BASE A LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA MISMA COMPARACIÓN	21
FIGURA 10. DIAGRAMA DE VENN GENERADO CON LA COMPARACIÓN DE LOS LISTADOS DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS PARA LOS TRES EFECTOS ANALIZADOS: DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN, TRANSGENERACIONAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN Y GENERACIÓN. LOS EFECTOS DE LA GENERACIÓN Y EL DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN COMPARTEN DIEZ PROTEÍNAS DIFERENCIALESS; LA GENERACIÓN Y EL TRANSGENERACIONAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN COMPARTEN QUINCE; EL DIRECTO Y EL TRANSGENERACIONAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN COMPARTEN SOLAMENTE UNA; Y LOS TRES EFECTOS TAMBIÉN COMPARTEN SOLAMENTE UNA.....	24
FIGURA 11. TÉRMINOS GO DE LA CATEGORÍA “PROCESO BIOLÓGICO” ENRIQUECIDOS EN EL LISTADO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS POR A) EL EFECTO DE LA GENERACIÓN (F1 VS F2); B) EL EFECTO DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN (F1 VS VF1); C) EL EFECTO TRANSGENERACIONAL DE LA MISMA (F2 VS VF2).	26
FIGURA 12. TÉRMINOS GO DE LA CATEGORÍA “FUNCIÓN MOLECULAR” ENRIQUECIDOS EN EL LISTADO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS POR A) EL EFECTO DE LA GENERACIÓN (F1 VS F2); B) EL EFECTO DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN (F1 VS VF1); C) EL EFECTO TRANSGENERACIONAL DE LA MISMA (F2 VS VF2).	27
FIGURA AI. 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS COEFICIENTES DE VARIACIÓN (CV) DE LOS PÉPTIDOS IDENTIFICADOS EN BASE A LA INTENSIDAD. EN EL EJE X SE REPRESENTA EL Nº DE PÉPTIDOS, MIENTRAS QUE EN EL EJE Y SE REPRESENTA EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV) DE LA INTENSIDAD EN LAS TRES CARRERAS.	43
FIGURA AI. 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS COEFICIENTES DE VARIACIÓN (CV) DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN BASE A LA INTENSIDAD. EN EL EJE X SE REPRESENTA EL Nº DE PROTEÍNAS, MIENTRAS QUE EN EL EJE Y SE REPRESENTA EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV) DE LA INTENSIDAD DE LAS TRES CARRERAS.	43
FIGURA AI. 3. DISTRIBUCIÓN DE LOS COEFICIENTES DE VARIACIÓN (CV) DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN BASE A LA INTENSIDAD “LABEL-FREE QUANTIFICATION” (LFQ). EN EL EJE X SE REPRESENTA EL Nº DE PROTEÍNAS, MIENTRAS QUE EN EL EJE Y SE REPRESENTA EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV) DE LA INTENSIDAD DE LAS TRES CARRERAS.	44
FIGURA AII. 1. GRÁFICO OBTENIDO CON EL ANÁLISIS DE LA COMPONENTE PRINCIPAL (ACP) DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA COMPARACIÓN F1 VS F2. LA COMPONENTE PRINCIPAL 1 (PC1; 65,2% DE LA VARIABILIDAD), SEPARA LAS MUESTRAS DEL GRUPO F1 DE LAS DEL GRUPO F2.	45
FIGURA AII. 2. HEATMAP OBTENIDO CON EL CLUSTERING DE LAS MUESTRAS DE LA COMPARACIÓN F1 VS F2 EN BASE A LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS DE LA MISMA COMPARACIÓN.....	46
FIGURA AII. 3. GRÁFICO OBTENIDO TRAS EL ANÁLISIS DE LA COMPONENTE PRINCIPAL (ACP) DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA COMPARACIÓN F1 VS VF1. LA COMPONENTE PRINCIPAL 1 (PC1; 66,5% DE LA VARIABILIDAD), SEPARA LAS MUESTRAS DEL GRUPO F1 DE LAS DEL GRUPO VF1.	47
FIGURA AII. 4. HEATMAP OBTENIDO CON EL CLUSTERING DE LAS MUESTRAS DE LA COMPARACIÓN F1 VS VF1 EN BASE A LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA MISMA COMPARACIÓN.....	48
FIGURA AII. 5. GRÁFICO OBTENIDO TRAS EL ANÁLISIS DE LA COMPONENTE PRINCIPAL (ACP) DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA COMPARACIÓN F2 VS VF2. LA COMPONENTE PRINCIPAL 1 (PC1; 68,3% DE LA VARIABILIDAD), SEPARA LAS MUESTRAS DEL GRUPO F2 DE LAS DEL GRUPO VF2.	49

FIGURA AII. 6. <i>HEATMAP</i> OBTENIDO CON EL CLUSTERING DE LAS MUESTRAS DE LA COMPARACIÓN F2 VS VF2 EN BASE A LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA MISMA COMPARACIÓN.....	50
FIGURA AIV. 1. GRÁFICO CIRCULAR OBTENIDO MEDIANTE PANTHER SOBRE LOS PROCESOS MOLECULARES AFECTADOS POR EL EFECTO DE LA GENERACIÓN (F1 VS F2).....	57
FIGURA AIV. 2. GRÁFICO CIRCULAR OBTENIDO MEDIANTE PANTHER SOBRE LAS FUNCIONES MOLECULARES AFECTADAS POR EL EFECTO DE LA GENERACIÓN (F1 VS F2).....	58
FIGURA AIV. 3. GRÁFICO CIRCULAR OBTENIDO MEDIANTE PANTHER SOBRE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS AFECTADOS POR EL EFECTO DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN (F1 VS VF1).....	59
FIGURA AIV. 4. GRÁFICO CIRCULAR OBTENIDO MEDIANTE PANTHER SOBRE LAS FUNCIONES MOLECULARES AFECTADAS POR EL EFECTO DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN (F1 VS VF1).	60
FIGURA AIV. 5. GRÁFICO CIRCULAR OBTENIDO MEDIANTE PANTHER SOBRE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS AFECTADOS POR EL EFECTO TRANSGENERACIONAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN (F2 VS VF2).	61
FIGURA AIV. 6. GRÁFICO CIRCULAR OBTENIDO MEDIANTE PANTHER SOBRE LAS FUNCIONES MOLECULARES AFECTADA .	62

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPARACIONES DE LAS POBLACIONES EXPERIMENTALES REALIZADAS DURANTE EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO...	16
TABLA 2. NÚMERO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS (CON UN P-VALUE ANOVA INFERIOR A 0,05) PARA CADA COMPARACIÓN ESTUDIADA, TENIENDO EN CUENTA LOS VALORES DE INTENSIDAD (COLUMNA DE LA IZQUIERDA) O DE INTENSIDAD "LABEL-FREE QUANTIFICATION" (LFQ; COLUMNA DE LA DERECHA).	19
TABLA 3. NÚMERO DE PROTEÍNAS SOBREENSPRESADAS EN LOS GRUPOS DE CADA COMPARACIÓN, CONSIDERANDO INTENSIDAD O INTENSIDAD LFQ.	22
TABLA 4. PORCENTAJE DE PROTEÍNAS, QUE ESTANDO DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS POR LA COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE INTENSIDAD: PRESENTAN UN FC SIGNIFICATIVO, TAMBIÉN SE ENCUENTRAN DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS AL COMPARAR LOS VALORES DE LFQ Y, DE LAS QUE COINCIDEN CON LFQ, LAS QUE PRESENTAN UN FC SIGNIFICATIVO.	23
TABLA AI. 1. TABLA RESUMEN DEL ENSAYO DE REPRODUCIBILIDAD. PARA LA DEPURACIÓN EN BASE A LA INTENSIDAD DE LOS PÉPTIDOS, EN BASE A LA INTENSIDAD DE LAS PROTEÍNAS Y EN BASE A LA INTENSIDAD "LABEL-FREE QUANTIFICATION" (LFQ) DE LAS PROTEÍNAS SE RECOGE: EL NÚMERO DE PÉPTIDOS O PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MaxQuant, EL NÚMERO DE PÉPTIDOS O PROTEÍNAS QUE QUEDAN TRAS DEPURAR LOS ARCHIVOS, EL NÚMERO DE PÉPTIDOS CON UN COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV) ACEPTABLE (< 20%) Y EL PROMEDIO Y LA MEDIANA DE LOS CV.	42
TABLA AIII. 1. PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS Y FILTRADA EN BASE A LOS VALORES DEL FOLD CHANGE (FC) DE LAS INTENSIDADES PROMEDIO Y DEL T-TEST PARA LA COMPARACIÓN F1 vs F2 (EFECTO DE LA GENERACIÓN).	51
TABLA AIII. 2. PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS Y FILTRADAS EN BASE A LOS VALORES DEL FOLD CHANGE (FC) DE LAS INTENSIDADES PROMEDIO Y DEL T-TEST PARA LA COMPARACIÓN F1 vs VF1 (EFECTO DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN).	52
TABLA AIII. 3. PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS Y FILTRADA EN BASE A LOS VALORES DEL FOLD CHANGE (FC) DE LAS INTENSIDADES PROMEDIO Y DEL T-TEST PARA LA COMPARACIÓN F2 vs VF2 (EFECTO TRANSGENERACIONAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN).	54
TABLA AV. 1. TABLA RESUMEN DEL RESULTADO OBTENIDO MEDIANTE DAVID. EN ELLA APARECEN LOS TÉRMINOS GO DE LA CATEGORÍA "PROCESO BIOLÓGICO" ENRIQUECIDOS EN EL LISTADO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS DE LA COMPARACIÓN F1 vs F2 (EFECTO DE LA GENERACIÓN), JUNTO CON SU DESCRIPCIÓN, EL NÚMERO DE PROTEÍNAS DEL MISMO QUE TIENEN EL TÉRMINO EN CUESTIÓN ASOCIADO, EL PORCENTAJE QUE REPRESENTAN DEL TOTAL DEL LISTADO Y EL P-VALOR OBTENIDO EN EL ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO.	63
TABLA AV. 2. TABLA RESUMEN DEL RESULTADO OBTENIDO MEDIANTE DAVID. EN ELLA APARECEN LOS TÉRMINOS GO DE LA CATEGORÍA "FUNCIÓN MOLECULAR" ENRIQUECIDOS EN EL LISTADO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS DE LA COMPARACIÓN F1 vs F2 (EFECTO DE LA GENERACIÓN), JUNTO CON SU DESCRIPCIÓN, EL NÚMERO DE PROTEÍNAS DEL MISMO QUE TIENEN EL TÉRMINO EN CUESTIÓN ASOCIADO, EL PORCENTAJE QUE REPRESENTAN DEL TOTAL DEL LISTADO Y EL P-VALOR OBTENIDO EN EL ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO.	64
TABLA AV. 3. TABLA RESUMEN DEL RESULTADO OBTENIDO MEDIANTE DAVID. EN ELLA APARECEN LOS TÉRMINOS GO DE LA CATEGORÍA "PROCESO BIOLÓGICO" ENRIQUECIDOS EN EL LISTADO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS DE LA COMPARACIÓN F1 vs VF1 (EFECTO DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN), JUNTO CON SU DESCRIPCIÓN, EL NÚMERO DE PROTEÍNAS DEL MISMO QUE TIENEN EL TÉRMINO EN CUESTIÓN ASOCIADO, EL PORCENTAJE QUE REPRESENTAN DEL TOTAL DEL LISTADO Y EL P-VALOR OBTENIDO EN EL ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO.	64
TABLA AV. 4. TABLA RESUMEN DEL RESULTADO OBTENIDO MEDIANTE DAVID. EN ELLA APARECEN LOS TÉRMINOS GO DE LA CATEGORÍA "FUNCIÓN MOLECULAR" ENRIQUECIDOS EN EL LISTADO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS DE LA COMPARACIÓN F1 vs VF1 (EFECTO DIRECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN), JUNTO CON SU DESCRIPCIÓN, EL NÚMERO DE PROTEÍNAS DEL MISMO QUE TIENEN EL TÉRMINO EN CUESTIÓN ASOCIADO, EL PORCENTAJE QUE REPRESENTAN DEL TOTAL DEL LISTADO Y EL P-VALOR OBTENIDO EN EL ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO.	65
TABLA AV. 5. TABLA RESUMEN DEL RESULTADO OBTENIDO MEDIANTE DAVID. EN ELLA APARECEN LOS TÉRMINOS GO DE LA CATEGORÍA "PROCESO BIOLÓGICO" ENRIQUECIDOS EN EL LISTADO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS DE LA COMPARACIÓN F2 vs VF2 (EFECTO TRANSGENERACIONAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN), JUNTO CON SU DESCRIPCIÓN, EL NÚMERO DE PROTEÍNAS DEL MISMO QUE TIENEN EL TÉRMINO EN CUESTIÓN ASOCIADO, EL	

PORCENTAJE QUE REPRESENTAN DEL TOTAL DEL LISTADO Y EL P-VALOR OBTENIDO EN EL ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO.....	66
TABLA AV. 6. TABLA RESUMEN DEL RESULTADO OBTENIDO MEDIANTE DAVID. EN ELLA APARECEN LOS TÉRMINOS GO DE LA CATEGORÍA "FUNCIÓN MOLECULAR" ENRIQUECIDOS EN EL LISTADO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS DE LA COMPARACIÓN F2 VS VF2 (EFECTO TRANSGENERACIONAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN), JUNTO CON SU DESCRIPCIÓN, EL NÚMERO DE PROTEÍNAS DEL MISMO QUE TIENEN EL TÉRMINO EN CUESTIÓN ASOCIADO, EL PORCENTAJE QUE REPRESENTAN DEL TOTAL DEL LISTADO Y EL P-VALOR OBTENIDO EN EL ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO.....	66

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACP	Análisis de Componentes Principales
ANOVA	Análisis de la varianza
CBR-1	Carbonil reductasa-1
CP	Componente principal
CV	Coefficiente de variación
DDAH-2	N(G),N(G)-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2
F0	Población de hembras cuyos embriones no son manipulados
F1	Población control de la generación 1
F2	Población control de la generación 2
FC	Fold-change
FDR	False Discovery Rate
GO	Ontología génica
LC	Cromatografía líquida
LC-MS/MS	Espectrómetro de masas en tándem acoplado a columna de cromatografía líquida
LFQ	"Label-free quantification"
m/z	Relación masa-carga
MeHg	Metilmercurio
mRNA	RNA mensajero
MS	Espectrómetro de masas
MS/MS	Espectrómetro de masas en tándem
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOSTRIM	Transportador de la óxido nítrico sintasa
PERC	Trans-2-enoil-CoA reductasa peroxisomal
REDOX	Oxidación-reducción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rRNA	RNA ribosomal
UGT	UDP-glucosiltransferasa
UGT1A3	UDP-glucuronosiltransferasa 1-3
UGT1A6	UDP-glucuronosiltransferasa 1-6
UGT2B4	UDP-glucuronosiltransferasa 2B4
VF0	Población de hembras cuyos embriones son manipulados
VF1	Población criopreservada de la generación 1
VF2	Población criopreservada de la generación 2

ANGLICISMOS

ANGLICISMOS

Bottom-up	Estrategia seguida en los ensayos proteómicos basados en MS que consiste en aislar las proteínas, digerirlas enzimática o químicamente en péptidos y analizar esta mezcla de péptidos en el MS.
Cluster	Grupo
Clustering	Agrupación
Complete-linkage	Uno de los métodos en los que se basa el algoritmo de agrupamiento jerárquico.
Fold-change	Aumento de proporción
HeatMap	Representación gráfica en la que los valores individuales contenidos en una matriz de datos son representados con colores.
Label-free	Estrategia de cuantificación en los ensayos basados en la espectrometría de masas que no requiere el marcaje de péptidos ni de proteínas con isótopos estables.
Label-free quantification	Herramienta del software MaxQuant que permite obtener las intensidades normalizadas de las proteínas identificadas, las cuales reciben el mismo nombre que dicha herramienta.
Match between runs	Herramienta del software MaxQuant que permite incluir entre las identificaciones a los péptidos que no se detectan en el espectro secundario en algunas muestras, pero cuyos péptidos precursores sí que aparecen en el espectro primario.
MS/MS counts	Valor que representa el número de veces que los péptidos secundarios de una proteína son detectados por el MS/MS, sin tener en cuenta la intensidad.
t-Test	Prueba estadística también conocida como Test-t o t de Student.
Top-down	Estrategia seguida en los ensayos proteómicos basados en MS que consiste en aislar las proteínas y en analizarlas directamente en el MS, sin haber una digestión (química o enzimática) previa.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Oryctolagus cuniculus* (conejo común; **Figura 1**), junto con otros roedores como los ratones o las ratas, es uno de las principales especies utilizadas en investigación en la Unión Europea (80%) (Comisión Europea 2013). Los usos más clásicos del conejo van desde la producción de anticuerpos, el desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas o el estudio de la fisiología y la toxicidad de nuevos fármacos (Shiomi and Ito 2009) hasta el estudio de numerosas enfermedades humanas, como cardiovasculares, oncológicas o pulmonares (Fischer et al. 2012; Kamaruzaman et al. 2013). Además, por sus características reproductivas también se ha utilizado como animal modelo en embriología y biología reproductiva (Viebahn 2001).

Desde el punto de vista reproductivo, el conejo se caracteriza por: no presentar anestro estacional, poseer un ciclo reproductivo corto (alrededor de 30 días) y ser una especie de ovulación inducida durante el coito (lo que permite conocer con exactitud la cronología del desarrollo embrionario) (Fischer et al. 2012; Tao and Niemann 2000). Además, el desarrollo embrionario hasta el noveno día presenta fases y estructuras parecidas a las del embrión humano (Hohn et al. 1992).

Por último, es un animal de pequeño tamaño, de fácil manejo y bajos costes de mantenimiento, por lo que reúne las características necesarias para ser utilizado como organismo modelo (Stübinger and Dard 2013).



Figura 1. Ejemplar de raza neozelandesa blanca.

1.1 Criopreservación

La criobiología se define como el estudio de los efectos que tienen las bajas temperaturas en los organismos vivos, y que tiene como objetivo conseguir preservar las células a bajas temperaturas evitando su muerte al mismo tiempo que se mantiene la funcionalidad de sus orgánulos intracelulares. Para ello, es necesario actuar sobre los dos

principales factores que comprometen la viabilidad: la formación de cristales y las altas concentraciones de solutos que se alcanzan (Edgar and Gook 2012; Kleinhans and Mazur 2007; Mazur 1963; Saenz de Juano 2014). Al minimizarlos o eliminarlos, es posible mantener la integridad celular y reanudar el funcionamiento biológico adecuado de las células tras la descongelación (Redondo, 2014).

1.1.1 Métodos de criopreservación

En 1949 surge la congelación lenta como técnica de criopreservación (Polge et al. 1949). Gracias a esta técnica fue posible obtener, para diferentes especies, la primera descendencia generada a partir de embriones criopreservados. Es el caso de los ratones (Whittingham et al. 1972), los conejos (Bank and Maurer 1974), las ovejas (Willadsen et al. 1976) o los humanos (Trounson and Mohr 1983). La congelación lenta fue empleada como única técnica de criopreservación hasta 1985, momento en el que surgió la vitrificación (Rall and Fahy 1985), definida como la solidificación de una solución a baja temperatura evitando la formación de cristales de hielo (Mukaida and Oka 2012). Actualmente, ambas se utilizan, aunque en los últimos años la vitrificación ha comenzado a sustituir a la congelación (Edgar and Gook 2012).

Las principales diferencias entre las dos técnicas se encuentran en la composición y concentración de los crioprotectores empleados y en las rampas de congelación. En el resto de etapas (almacenamiento, descongelación o rehidratación) prácticamente no hay diferencias (Vajta and Kuwayama 2006). De forma general, en la congelación lenta se utilizan soluciones relativamente poco concentradas y ratios de enfriamiento lentos, mientras que en la vitrificación las soluciones están altamente concentradas y la ratio de enfriamiento es muy rápida (Kasai 1996; Leibo 2008; Rall and Fahy 1985). Las condiciones de la vitrificación pueden ser perjudiciales para las células, pero son necesarias para que el fluido vitrifique y no cristalice (Kasai 1996; Mukaida and Oka 2012) (**Figura 2**).



Figura 2. A) Estado cristalino generado por la congelación del fluido y B) estado vítreo generado por la vitrificación del fluido.

1.1.2 Importancia de la criopreservación en la reproducción

La conservación y almacenaje tanto de gametos como de embriones es fundamental en el avance de la medicina y de la reproducción asistida (Woods et al. 2004). Por esta razón, la criopreservación tiene un papel importante en el área de la reproducción, ya que permite

mantener gametos y embriones durante un largo periodo de tiempo, abriendo así la posibilidad de alargar o mejorar la fertilidad de los pacientes (Song et al. 2010).

La simplicidad y resistencia del semen lo convirtió en el mejor candidato inicial en el uso de las técnicas de criopreservación. De hecho, desde el desarrollo de estas técnicas, tanto en reproducción asistida humana, así como en el mundo de la producción animal se ha empleado el semen congelado para la inseminación artificial. No obstante, con el desarrollo de la fecundación *in vitro*, los métodos de preservación de la fertilidad avanzaron, pasando también a la criopreservación de ovocitos y embriones, e incluso de tejidos reproductivos (Song et al. 2010). De todas estas técnicas, la criopreservación en fase embrionaria temprana es quizás la herramienta más importantes, tanto en el área de la reproducción humana asistida, al permitir mantener todos los embriones generados en un ciclo reproductivo, así como en la conservación de líneas específicas de mamíferos, ya que permite mantener todo el paquete genético aportado por los progenitores protegiendo la integridad y heterocigosis de la población en cuestión (García and Baselga 2002).

1.1.3 Efectos de la criopreservación en embriones

Durante la el proceso de criopreservación, las células embrionarias sufren daños, pero en el caso de los embriones estos no son letales para todas (Vajta and Kuwayama 2006). Esto se debe a que el daño provocado no depende sólo del proceso en sí, sino también de otros factores relacionados con el protocolo o con las características del propio embrión (Dalcin et al. 2013; Pereira and Marques 2008; Vajta and Kuwayama 2006).

Hasta hace poco, se pensaba que la criopreservación embrionaria era una técnica neutral para los embriones que sobrevivían (Saenz-De-Juano et al. 2014), ya que en ellos no parecía dejar mella. Sin embargo, estudios en embriones de mamífero han demostrado que esto es falso (Aksu et al. 2012; Mamo et al. 2006; Wang et al. 2010; Zhao et al. 2012). Concretamente en el modelo conejo, se han detectado cambios en el desarrollo de la placenta y pérdidas fetales durante la segunda parte de la gestación (Marco-Jiménez et al. 2013; Mocé et al. 2010; Saenz-De-Juano et al. 2014; Vicente et al. 2013), los cuales han sido asociados con alteraciones en la expresión génica y proteica de la placenta (Saenz-De-Juano et al. 2014) que permanecen durante toda la gestación (Saenz-de-Juano et al. 2015) sin implicaciones fenotípicas sobre los individuos.

1.1.4 Por qué evaluar el efecto de la criopreservación embrionaria en el animal adulto y su descendencia

La interacción entre un organismo y su entorno produce modificaciones epigenéticas que pueden resultar en nuevos fenotipos en el individuo adulto, los cuales pueden transmitirse a la descendencia aún sin implicar cambios en el código genético (Kovalchuk 2012). Esto se conoce como cambio fenotípico transgeneracional (Skinner 2008). En

modelos murinos se ha asociado la exposición prenatal a factores como la cafeína o el etanol con modificaciones epigenéticas (Shen et al. 2014; L. Wang et al. 2014), las cuales son además transgeneracionales, es decir, que también afectan a generaciones posteriores y no solo a la primera línea de la descendencia (Lavara et al. 2014; Luo et al. 2014; Redondo 2014). Estudios previos en los que se evalúan los efectos de la criopreservación manifestados en adultos o en su descendencia son escasos. Redondo (2014) observó que la vitrificación inducía alteraciones en el proteoma hepático de machos adultos. Dichas alteraciones podrían estar detrás del cambio fenotípico en el hígado de adultos que provenían de poblaciones vitrificadas, que registraban un menor tamaño del hígado (Lavara et al. 2015). Además, Lavara et al. (2014) observaron en un análisis de las características reproductivas de las hembras que la vitrificación embrionaria tenía efectos transgeneracionales.

1.1.5 Cómo evaluar los efectos provocados por la criopreservación

A pesar de que la supervivencia del embrión a la criopreservación es necesaria, no es suficiente como para asegurar la implantación y el desarrollo embrionario. También se requiere mantener un funcionamiento fisiológico correcto (Edgar and Gook 2012). La evaluación de los efectos que tiene la criopreservación sobre el embrión superviviente se puede realizar tanto a nivel de embrión como a nivel de individuo adulto.

A nivel de embrión, desde que surgieron las técnicas de reproducción asistida, quedó demostrado que hay una relación directa entre la calidad del embrión y el éxito de la gestación. Por ello, evaluar la calidad y morfología del mismo ha sido una técnica bastante extendida a la hora de evaluar la eficacia de una técnica reproductiva (Rocha et al. 2016). El estudio de la morfología del embrión es la metodología más tradicional para evaluar los efectos provocados por la criopreservación (Saenz de Juano 2014) sin embargo, además de estar sujeta a la subjetividad del operario (Rocha et al. 2016), no es una técnica que permite definir el estado fisiológico del embrión (Katz-Jaffe and Gardner 2007), y por ello no permite distinguir aquellos embriones que conseguirán implantar de los que no (Saenz de Juano 2014).

Una alternativa que permitiría determinar de forma más precisa el estado fisiológico del embrión es la evaluación de su desarrollo *in vitro*, hasta el estadio de blastocisto en eclosión (Viudes-De-Castro et al. 2010; Saenz de Juano 2014). Sin embargo la evaluación del desarrollo *in vivo* es la única metodología que permite una evaluación precisa, ya que no solo permite determinar qué embriones son capaces de alcanzar el estadio de blastocisto, sino también permite determinar cómo estos se desarrollan *in vivo* hasta el final de la gestación (Saenz de Juano 2014). Como ejemplo, Lavara et al. (2011) determinaron que el

almacenamiento de embriones vitrificados en nitrógeno líquido es un método efectivo que mantiene su viabilidad durante al menos quince años.

Por otro lado, si la evaluación del efecto de la criopreservación sobre el embrión se realiza a nivel de individuo adulto, la opción más extendida hasta hace pocos años era analizar los rasgos fenotípicos del adulto. Así fue como Lavara et al. (2014) asociaron la criopreservación embrionaria a alteraciones en rasgos reproductivos de conejas. Sin embargo, en los últimos años, gracias al desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación se abrieron nuevas posibilidades para evaluar los daños inducidos por la criopreservación, tanto en embriones como en los individuos adultos. De hecho, este tipo de análisis ha ido ganando campo ya que aumentan las posibilidades de poder entender las alteraciones fisiológicas (Saenz de Juano 2014) que expliquen las diferencias detectadas en el desarrollo embrionario o en el fenotipo del individuo adulto.

A nivel de embrión, existen diferentes estudios que han evaluado el efecto de la criopreservación embrionaria tanto sobre el transcriptoma (Aksu et al. 2012; Mamo et al. 2006), así como sobre el proteoma (Katz-Jaffe et al. 2006; Saenz-De-Juano et al. 2014). No obstante, en individuos adultos este tipo de estudios son escasos. Sin embargo, hay que considerar que la relación establecida, especialmente en las especies de mamíferos, entre la madre y el hijo durante la gestación y la lactancia puede contribuir a cómo es el individuo adulto al final (Lavara et al. 2014; Stamps 2003).

1.2 Estudio proteómico

Antes de la aparición de las técnicas conocidas como “-ómicas”, el estudio de los procesos o sistemas biológicos se basaba en el análisis individual de los genes implicados, de su expresión o de las proteínas que codificaban (Aryal and Sherman 2016). Sin embargo, con esta aproximación tener una idea global del proceso era complicado (Saenz de Juano 2014). Gracias al desarrollo de las tecnologías de secuenciación genómica y de genómica funcional, y a la consecuente aparición de las técnicas “-ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica o metabolómica), el enfoque ha evolucionado. De hecho, las nuevas tecnologías permiten no solo estudiar el genoma de forma global y estática, sino también realizar estudios sobre su dinámica: la transcripción y traducción de genes, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas o las interacciones proteína-proteína (Aryal and Sherman 2016).

La proteómica, definida como el estudio de todas las proteínas presentes en una muestra, permite relacionar la genómica y la transcriptómica con las estructuras celulares, funciones y rutas que dan lugar a los rasgos fenotípicos de un organismo (Aryal and Sherman 2016) puesto que las proteínas, que constituyen este proteoma, son las principales unidades estructurales y funcionales de las células (Karpievitch et al. 2010). Por ello, y

considerando además que el nivel de RNA mensajero (mRNA) no siempre se corresponde con el de la proteína, el análisis del proteoma adquiere un papel relevante a la hora de entender la funcionalidad de un sistema biológico (Karpievitch et al. 2010). No obstante, el estudio del proteoma presenta sus limitaciones: es espacial, temporal y químicamente dinámico (Angel et al. 2012), y cualquier alteración en las modificaciones de una proteína o en sus interacciones puede tener un impacto en los rasgos fenotípicos (Aryal and Sherman 2016).

1.2.1 Métodos para realizar un estudio proteómico

Las metodologías que se han utilizado para los estudios proteómicos han ido evolucionando, especialmente en los últimos años. La técnica más utilizada para el estudio de proteoma es el gel de electroforesis bidimensional (gel 2D), en el cual se pueden evaluar tanto las diferencias en el perfil proteico entre grupos experimentales como obtener una aproximación a la cuantificación de una proteína concreta. Sin embargo, la técnica está algo limitada por la falta de métodos robustos y reproducibles que permitan la detección, el apareamiento y la cuantificación de las bandas (Ong and Mann 2005). Las limitaciones de los geles 2D impulsaron el desarrollo de técnicas libres de geles. Una de ellas es el uso de microarrays de proteínas, aunque esta técnica está limitada por la necesidad de anticuerpos específicos para cada proteína interrogada, que normalmente no están disponibles o son costosos de desarrollar (Karpievitch et al. 2010).

En la actualidad, es posible utilizar metodologías basadas en la espectrometría de masas (Aryal and Sherman 2016). Esta técnica, la cual identifica moléculas ionizadas por su relación masa-carga (m/z) (Karpievitch et al. 2010), se presenta como una efectiva alternativa para identificar y cuantificar proteínas en muestras complejas (Nesvizhskii et al. 2007). Además, en comparación con la metodología basada en geles 2D, es mucho más rápida, reproducible, aporta resultados más fiables (especialmente a nivel cuantitativo) y tiene una mejor resolución. Así, aunque continúan utilizándose los geles 2D, los ensayos con espectrómetros de masas (MS) se van imponiendo, especialmente cuando se trata de realizar análisis de muestras complejas (Karpievitch et al. 2010).

Dentro de los métodos proteómicos basados en MS hay dos estrategias diferentes para analizar el proteoma: “bottom-up” y “top-down”. “Bottom-up” es la estrategia más común, la cual consiste en aislar las proteínas, digerirlas enzimática o químicamente en péptidos y en analizar esta mezcla compleja de péptidos en el MS. Por el contrario, en la estrategia “top-down” no hay una digestión previa de las proteínas, sino que estas se analizan intactas. Esto permite obtener información de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas, pero dado que los espectros generados son más complicados de interpretar, su uso está limitando a muestras más simples (Han et al. 2008).

Por ello, la estrategia más extendida en los estudios proteómicos cuantitativos es la estrategia “bottom-up” (Angel et al. 2012).

1.2.2 Ensayo bottom-up LC-MS/MS

Generalmente, en los estudios proteómicos cuantitativos de tipo “bottom-up” se recurre a los espectrómetros de masas en tándem (MS/MS) acoplados a una columna de cromatografía líquida (LC) (Aryal et al. 2014; Aryal and Sherman 2016; Hakimi et al. 2017; Song et al. 2010).

La idea básica de este ensayo es que un extracto proteico es digerido de forma enzimática o química, dando lugar a una mezcla peptídica compleja (Aryal and Sherman 2016). Esta mezcla es analizada, en primer lugar, por una LC, la cual es generalmente de fase reversa (fase estacionaria apolar, fase móvil polar) y separa a los péptidos en función de su hidrofobicidad (Karpievitch et al. 2010). Gracias a este fraccionamiento la complejidad de la muestra se reduce, facilitando así la identificación de los péptidos en la siguiente etapa, el MS.

A medida que se va eluyendo la muestra, los péptidos del LC llegan a la fuente de ionización del MS, donde se ionizan. Estos péptidos ionizados alcanzan el analizador de masas, que los separa en función de su m/z y, por último, llegan al detector, el cual recoge el número de iones que hay para cada m/z , generando así la intensidad de cada m/z . Con los m/z detectados y sus correspondientes intensidades se genera el espectro primario (Aryal and Sherman 2016; Karpievitch et al. 2010). En este punto, por ser un MS/MS, se seleccionan diferentes péptidos precursores y se fragmentan (dentro del propio equipo) por diferentes métodos (Angel et al. 2012; Karpievitch et al. 2010). Los nuevos fragmentos, son analizados y detectados por el segundo MS, generando el espectro secundario (Steen and Mann 2004).

Realizar un ensayo MS/MS y no un MS supone que la información obtenida de los péptidos aislados es más detallada (Angel et al. 2012; Karpievitch et al. 2010), permitiendo así una mejor identificación de los péptidos.

Con la información del primer y segundo espectro, el MS genera los archivos que contienen la información necesaria para realizar el análisis cualitativo y cuantitativo del proteoma (Karpievitch et al. 2010). El paso final en un estudio proteómico es emplear herramientas bioinformáticas que permitan analizar e interpretar los resultados obtenidos en los análisis realizados, permitiendo así encontrarle el sentido biológico a los mismos (Aryal and Sherman 2016).

En la **Figura 3** (Aryal and Sherman 2016) se plasma el flujo de trabajo de un ensayo proteómico bottom-up típico.

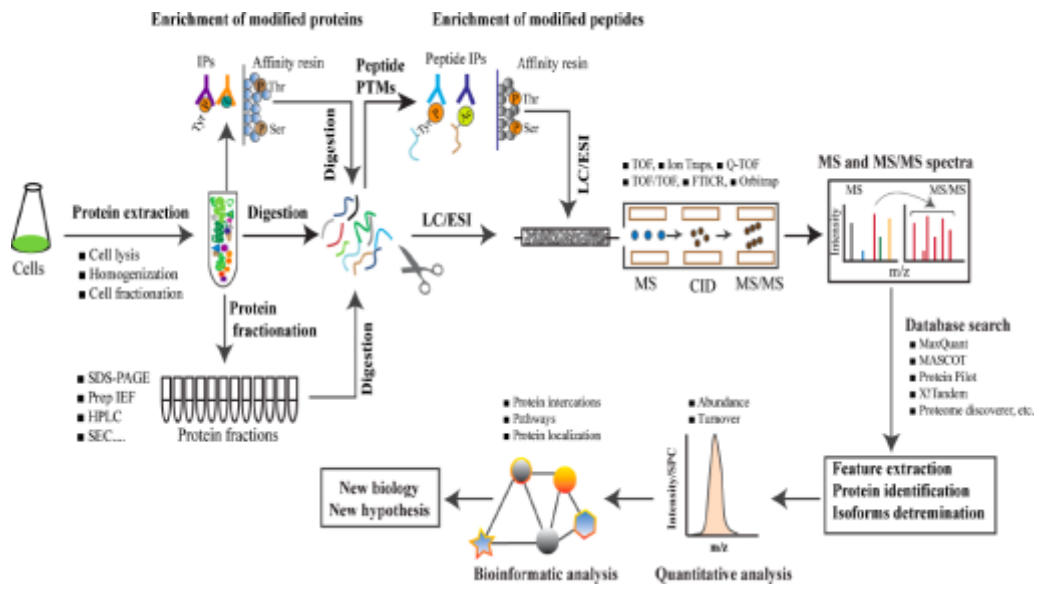


Figura 3. Flujo de trabajo seguido en un ensayo "bottom-up" típico (Aryal and Sherman 2016)

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este estudio es determinar si el proceso de criopreservación embrionaria temprana induce modificaciones en el proteoma del hígado de un individuo adulto y, en caso afirmativo, si estas modificaciones son heredadas por su descendencia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales

Los animales utilizados en el presente estudio pertenecen a la línea R, línea paternal de origen californiana (**Figura 4**) desarrollada en el ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Animal) de la UPV (Universidad Politécnica de Valencia). Todos los procedimientos llevados a cabo en este estudio fueron realizados acorde con la normativa europea sobre experimentación animal Directiva 2010/63/EU y revisados y aprobados por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad Politécnica de Valencia (código 2015/VSC/PEA/00061).



Figura 4. Ejemplar de raza californiana (línea R).

3.2. Diseño experimental

Un resumen del diseño experimental se muestra en la **Figura 5**. Brevemente, en el experimento se utilizaron 4 grupos experimentales, correspondientes con animales nacidos después de haber sido sometidos a la crioconservación de embriones (**VF1**) o no (grupo control, **F1**) y a la descendencia de ambos grupos (**VF2**, animales nacidos de animales crioconservados **VF1** y **F2** animales nacidos de los animales control **F1**).

Las poblaciones experimentales se establecieron de la siguiente forma. En primer lugar, se cruzaron machos de la línea de producción R con hembras de la misma línea R. Estas hembras fueron divididas en dos poblaciones, **F0** y **VF0**. La **F0** continuó con la gestación sin ninguna manipulación, y su descendencia dio lugar a la población **F1**. Por otro lado, en la población **VF0** se recuperaron embriones a las 72 horas post-inseminación (día 3), tal y como se describe en Redondo (2014), para su posterior vitrificación y descongelación según el protocolo descrito por Vicente et al. (1999). Una vez descongelados, los embriones fueron transferidos a hembras de la línea maternal A según

el procedimiento descrito por Besenfelder y Brem (1993). La descendencia de la población **VF0** constituyó la población **VF1**.

La población **F2** se obtuvo tras cruzar individuos de la población **F1**, mientras que la población **VF2** se obtuvo cruzando individuos de la población **VF1**.

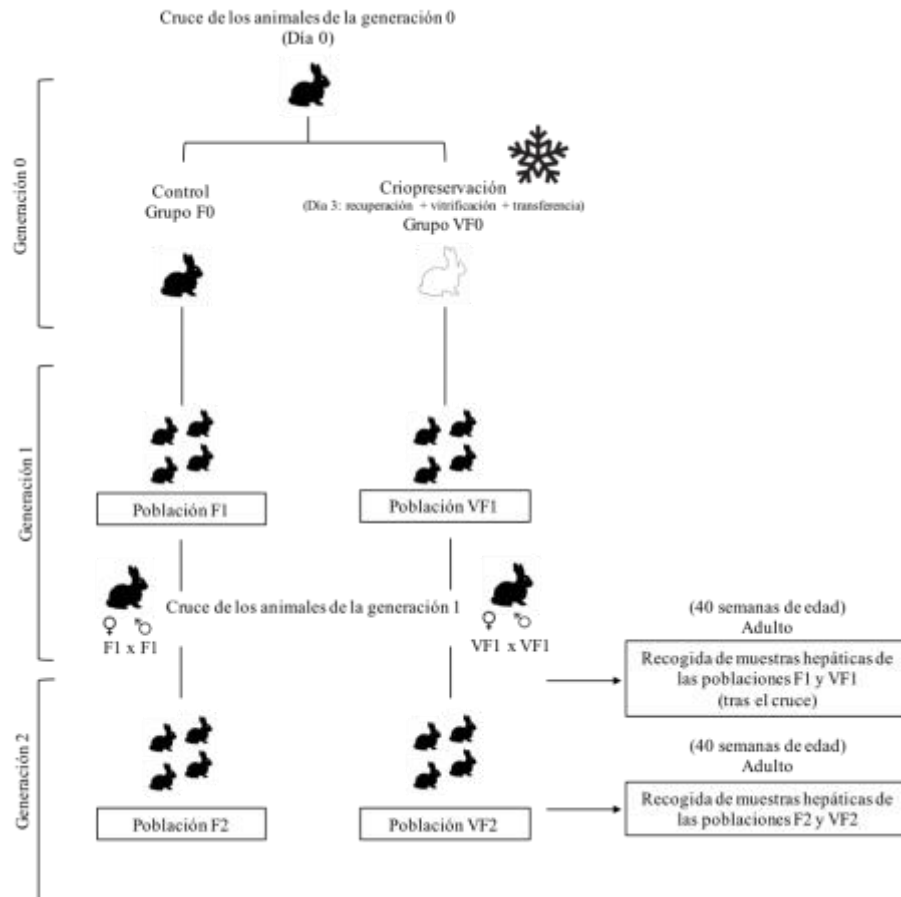


Figura 5. Esquema del diseño experimental seguido

3.3. Obtención de las muestras

Todos los animales, independientemente de la población (**F1**, **F2**, **VF1** y **VF2**) fueron mantenidos hasta la edad adulta (40 semanas), para su posterior sacrificio (4 machos por población experimental) tras la inyección de 0,6 g de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A.). De cada individuo se recogieron muestras de hígado (**Figura 6**) que fueron almacenadas a -80°C tras ser inmersos previamente en nitrógeno líquido hasta su uso. Todas las muestras fueron procesadas al mismo tiempo,



Figura 6. Hígado de conejo a partir del cual se realizó el estudio proteómico.

procesado que consistió en: precipitar las proteínas, reducir y alquilar las cisteínas, digerir enzimáticamente (con un cóctel enzimático de tripsina y lisina) las proteínas, purificar los péptidos generados con columnas tipo C18 (MicroSpin Column 96/pk C18 Silica, The Nest Group, Inc.) para eliminar los posibles contaminantes y preparar la mezcla peptídica para el ensayo LC-MS/MS.

Los individuos seleccionados para el análisis del proteoma hepático fueron masculinos por ser más estables hormonalmente. Por otro lado, se decidió analizar tejido hepático porque, además de ser un tejido bastante homogéneo y de gran importancia metabólica, en un estudio reciente se observó que la manipulación de embriones reducía el peso del hígado de los adultos (de 40 semanas de edad) (Lavara et al. 2015).

3.4. Ensayo LC-MS/MS

Una vez se tuvieron todas las muestras preparadas, todas ellas se analizaron al mismo tiempo en un equipo Dionex Ultimate 3.000 RSLC Nano System acoplado a un espectrómetro Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap MS (Thermo Scientific, Waltham, MA) (Figura 7).



Figura 7. Imagen del espectrómetro de masas empleado en el ensayo: Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap MS, de Thermo Scientific (Waltham, MA).

Inicialmente, 5 μ L de muestra (\sim 1 μ g de proteína) se cargaron en una columna (20 μ m x 350 mm) y se lavaron con un flujo de 5 μ L/min de 2% ACN 0,01% FA. Tras 5 minutos, esta columna de lavado se combinó con una columna analítica de fase reversa Acclaim PepMap RSLC C18 (75 μ m x 15 cm), la cual separó los péptidos utilizando un gradiente de fase móvil compuesto por la fase móvil A (0,01% FA) y la fase B (80% ACN 0,01% FA). El gradiente lineal, utilizando un régimen de 120 minutos y un flujo de 300 nL/min, comenzó con 5% B y alcanzó el 30% B a los 80 minutos, el 45% a los 91 minutos y el 100% a los 93. Una vez alcanzado el 100% B se dejó durante 5 minutos y, finalmente, se dejó 20 minutos al 5% B. Posteriormente, la muestra se inyectó en el QE-HF mediante la fuente iónica Nanospray Flex, equipada con la fuente de emisión de Thermo Scientific. El uso previo de la columna hizo que la muestra llegase fraccionada al QE-HF, lo que redujo su complejidad y facilitó la detección de los péptidos.

Las muestras se analizaron en orden aleatorio para minimizar el efecto de la variación del equipo y, además, se realizaron tres carreras de una misma muestra para evaluar la reproducibilidad del ensayo.

3.5. Análisis bioinformático de los archivos

3.5.1 MaxQuant

Para el análisis cualitativo y cuantitativo del perfil proteico de las muestras se puede recurrir a diferentes estrategias, siendo una de las más comunes la búsqueda en bases de datos. Utilizando programas como Mascot o MaxQuant, por un lado, se emparejan los espectros secundarios obtenidos con los generados a partir de la fragmentación teórica de las secuencias de una base de datos. Así se identifican los péptidos y en base a ellos, las proteínas. Y por otro lado, se calculan sus cantidades, de forma relativa o absoluta, a partir de las intensidades detectadas (Aryal and Sherman 2016).

En este estudio se utilizó el programa MaxQuant (www.biochem.mpg.de, versión 1.5.5.1, Max Planck Institute of Biochemistry), un software libre diseñado para ser utilizado desde Windows. Con él se identificaron y cuantificaron los péptidos y proteínas de una muestra en base a una serie de parámetros y utilizando una base de datos previamente elegida (Cox and Mann 2008).

3.5.1.1 Elección de la base de datos

La elección de la base de datos determinará los resultados obtenidos, por eso debe escogerse correctamente teniendo en cuenta el número de secuencias, el orden taxonómico y el nivel de anotación de las secuencias, intentando evitar la presencia de secuencias duplicadas (la misma proteína anotada para dos especies distintas). En este experimento, se ha utilizado la base de datos UniprotKB (www.uniprot.org, actualizada a 10/11/2016) para el taxón *Oryctolagus cuniculus* (taxón 9986), que contiene tanto secuencias de Swiss-Prot, manualmente anotadas y revisadas, como secuencias de TrEMBL, anotadas automáticamente y no revisadas.

3.5.1.2 Parámetros utilizados

Los parámetros utilizados para el análisis del conjunto de espectros de masas con MaxQuant se escogieron en función del tamaño de la base de datos y de la preparación de las muestras:

- Tolerancia de la primera búsqueda de péptidos: 20 ppm.
- Tolerancia de la principal búsqueda de péptidos: 4,5 ppm.
- Otros parámetros específicos del equipo: por defecto.
- Enzimas: Tripsina y LysC.
- Modificaciones: oxidación (variable) y carbamidometilación (fija).
- Parámetros globales de identificación de las secuencias: por defecto.

- False Discovery Ratio (FDR): 0,01.
- Opción “Match between runs” activada (Match time window = 1 min, Alignment Time Window = 20 min).
- Opción “Label-free quantification” activada.

La opción “**Match between runs**” fue considerada puesto que permitía incluir entre las identificaciones a aquellos péptidos que no se detectaban en el espectro secundario en algunas muestras, pero cuyos péptidos precursores sí que aparecían en el espectro primario.

La normalización de las intensidades es un punto importante, especialmente en las estrategias cuantitativas sin marcaje (o “label-free”). Hay diferentes formas de hacerlo, pero algunas son incompatibles con el fraccionamiento previo de la muestra. Con un algoritmo desarrollado recientemente, MaxLFQ (integrado en MaxQuant), se soluciona este problema de las incompatibilidades. Una vez tiene identificadas a las proteínas, busca aquellas cuyas intensidades difieren muy poco entre todas las muestras (no se ven afectadas por las condiciones estudiadas ni por las experimentales) y normaliza las intensidades del resto de proteínas en base a las de estas (Cox et al. 2014). Estas intensidades normalizadas generalmente se conocen como intensidades “Label-free Quantification” o LFQ. La herramienta “**Label-free quantification**” se consideró ya que con ella se obtuvieron estas intensidades LFQ.

3.5.2 Análisis de la reproducibilidad

Para validar la reproducibilidad del ensayo, una muestra peptídica fue cargada tres veces en el espectrómetro. Los archivos obtenidos se analizaron con MaxQuant utilizando la misma base de datos y los mismos parámetros de búsqueda detallados previamente (sin considerar el “Match between runs” en este caso), y fueron depurados siguiendo las mismas reglas de filtrado, explicadas en los apartados posteriores.

Para cada péptido y proteína identificada en alguno de las carreras de la muestra se calculó el coeficiente de variación (CV) de sus valores de intensidad y de intensidad LFQ en las tres carreras, así como la media y la mediana del coeficiente de variación del conjunto de péptidos y proteínas.

3.6. Depuración de los archivos generados

MaxQuant genera una serie de carpetas y archivos con toda la información obtenida a partir de los espectros de masas. El archivo con la lista de proteínas identificadas y sus valores de intensidad e intensidad LFQ (llamado proteincGroups.txt) fue depurado para continuar con el análisis cuantitativo del proteoma hepático.

En primer lugar, se descartaron las proteínas identificadas como contaminantes o como proteínas con secuencia reversa. Posteriormente, se aplicaron distintos filtros,

basados en los valores de “MS/MS counts” y de intensidad (o intensidad LFQ) para seleccionar las proteínas para el posterior análisis cuantitativo:

- **“MS/MS counts”**: este valor representa el número de veces que una proteína (sus péptidos secundarios) es detectada por el MS/MS, sin tener en cuenta la intensidad. Aquellas proteínas con un valor inferior o igual a 1 se descartaron.

- **Intensidad o intensidad LFQ**: este valor representa el nivel de expresión (o expresión normalizada) de la proteína en la muestra. Aquellas proteínas con valor nulo en la suma de las intensidades (o intensidades LFQ) de todas las muestras se eliminaron. Así pues, se obtuvieron dos archivos distintos tras esta etapa de depurado, en función de si se realizó en base a la intensidad o a la intensidad LFQ.

Además, con la finalidad de no eliminar proteínas durante el análisis estadístico, puesto que aquellas proteínas que no presentaban señal en al menos tres muestras en todos los grupos no serían incluidas por defecto en el análisis estadístico posterior, se asignó el valor mínimo de intensidad (o intensidad LFQ) detectado en una muestra en su conjunto a aquellas proteínas con intensidad nula en todas las muestras de uno o más grupos experimentales pero que presentaban señal de intensidad en el resto de grupos en al menos tres de las muestras.

3.7. Análisis estadístico

Al tratarse de un ensayo LC-MS/MS “label-free” o sin marcaje, el análisis estadístico se basó en los valores de intensidad e intensidad LFQ de las proteínas identificadas. Se utilizó el software InfernoRDN (www.omics.pnl.gov, Pacific Northwest National Laboratory, versión 1.1.6109), una aplicación desarrollada para Windows que proporciona una interfaz más sencilla que el paquete estadístico R (versión 3.3.1) para el tratamiento y análisis estadístico de grandes conjuntos de datos, así como el programa Microsoft Excel del paquete Office para Windows (versión 15.32 (170309), Windows®).

Las intensidades (e intensidades LFQ) se compararon entre las diferentes poblaciones experimentales, entre pares y otras combinaciones, de acuerdo a la **Tabla 1**. Aunque se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de todas las comparaciones recogidas en la **Tabla 1**, el posterior filtrado y análisis funcional se realizó solo para aquellas comparaciones que resultaban de mayor interés para el estudio, puesto que respondían a los objetivos del mismo. De esta forma, se consideraron:

- **F1 vs F2**. Permite observar los cambios determinados por la generación.
- **F1 vs VF1**. Revela si la criopreservación embrionaria de una población tiene efectos sobre el proteoma hepático del individuo una vez ha alcanzado que la edad adulta.

- **F2 vs VF2.** Permite comprobar si la criopreservación en fase embrionaria de una población tiene efecto en el proteoma hepático de su descendencia.

Además, también se consideró la comparación **F1 vs F2 vs VF1 vs VF2** con el fin de identificar si hay una población experimental marcadamente diferente al resto.

Tabla 1. Comparaciones de las poblaciones experimentales realizadas durante el análisis estadístico.

COMPARACIONES
F1 vs F2 vs VF1 vs VF2
F2 vs F1+VF1+VF2
F2 vs F1+VF1+VF2
VF1 vs F1+F2+VF2
VF2 vs F1+F2+VF1
F1+VF1 vs F2+VF2
F1 vs F2
F1 vs VF1
F1 vs VF2
F2 vs VF1
F2 vs VF2
VF1 vs VF2

3.7.1 Análisis de varianza (ANOVA)

En primer lugar, se realizó un ANOVA utilizando el programa InfernoRDN. Las intensidades (e intensidades LFQ) de las proteínas presentes en los archivos depurados fueron tomadas como variables para comprobar si se encontraban diferencialmente expresada en cada comparación entre poblaciones experimentales, con un nivel de significación del 0,05.

3.7.2 HeatMap y Análisis de Componentes Principales (ACP)

De cada comparación de interés (descritos anteriormente) se creó, también utilizando InfernoRDN, un “HeatMap” con un dendograma. Estos HeatMap, obtenidos con el algoritmo de agrupamiento jerárquico basado en el método “Complete-linkage”, muestran el grado de similitud y la distancia euclídea entre muestras, así como sobre su organización en “clusters” en función de la expresión de las proteínas diferencialmente expresadas entre las poblaciones. Además, también se construyeron gráficos de dispersión basados en el ACP de la intensidad de este conjunto de proteínas.

3.7.3 Fold-change (FC) y t-Test

Para verificar la consistencia de las diferencias determinadas en cada comparación se utilizó el programa Microsoft Excel. Se realizó un filtrado basado en el FC (que se define a

continuación) y el estadístico T del t-Test de aquellas proteínas con un p-valor en el ANOVA inferior a 0,05 para las tres comparaciones mencionadas anteriormente. Así pues, se consideró:

- El FC de la intensidad promedio de las proteínas, que se definió como FC promedio (1).

$$FC \text{ promedio} = \frac{\text{media grupo A}}{\text{media grupo B}} - 1 \quad (1)$$

- El estadístico T, obtenido mediante un t-Test de dos colas con los valores de intensidad de cada proteína en las muestras de cada uno de los dos grupos considerados (considerando que no hay varianza entre grupos).
- El FC de la intensidad de cada proteína en una muestra de un grupo respecto a la intensidad promedio de otro grupo (el grupo con que se compara), que se definió como FC individual (2).

$$FC \text{ individual} = \frac{\text{muestra n del grupo A}}{\text{media grupo B}} - 1 \quad (2)$$

En base a estas variables, se establecieron unas reglas para descartar aquellas proteínas cuya expresión diferencial entre grupos era menos consistente, y así realizar el análisis funcional solo con las proteínas que diferían entre grupos con una mayor seguridad:

I. Se mantuvieron las proteínas con un FC promedio superior o igual a 1, o inferior o igual a -0,5, o con un estadístico T inferior a 0,05 (siempre que el FC promedio fuera superior o igual a 0,5 o inferior o igual a -0,3).

II. De las proteínas que cumplían la regla I, se mantuvieron aquellas en que al menos el FC individual en 3 muestras del grupo A era positivo (o negativo) y en 3 muestras del grupo B era negativo (o positivo).

3.8. Análisis funcional

Al tratarse de un ensayo proteómico, el número de proteínas con el que se trabaja es alto. Es por ello que se decidió realizar el análisis funcional utilizando los términos de ontología génica (GO) asociados a las proteínas, en vez de realizar una interpretación individual de cada una de ellas. La anotación de la base de datos de proteínas de UniProt empleada en el estudio es limitada. De hecho, aproximadamente un 60% de las proteínas diferencialmente expresadas presentan una anotación de baja calidad (anotadas como “*Uncharacterized proteins*”). La solución adoptada fue recurrir a la base de datos de proteínas humanas de Uniprot (*Homo sapiens*, taxón 9606), que es mucho más completa, evitando así que parte de las proteínas no se considerasen en el análisis por falta de anotación. Mediante la herramienta BLAST de UniProt se obtuvo para cada proteína el

identificador de la proteína humana más similar. Los nuevos listados generados con los identificadores humanos fueron los utilizados en los siguientes pasos del análisis funcional.

La primera parte del análisis funcional consistió en identificar qué proteínas diferencialmente expresadas eran exclusivas de cada efecto estudiado (el efecto de la generación, el directo de la criopreservación y el transgeneracional de la criopreservación en la siguiente generación) y cuáles eran compartidas. Para ello se generó un diagrama de Venn. En la segunda parte, se analizaron los procesos o funciones biológicos asociados a las proteínas de cada listado obtenido. Por un lado, se utilizó un programa informático, Panther (www.pantherdb.org, versión 11.1) (Mi et al. 2013), con el que se determinó cómo se distribuían los términos GO asociados a las proteínas en las siguientes categorías: “Función Molecular” y “Proceso biológico”. Por otro lado, utilizando el programa DAVID (www.david.ncifcrf.gov, versión 6.8) (Dennis Jr et al. 2003), se analizó el grado de enriquecimiento de los términos GO en cada listado. Con el término GO enriquecido y el p-valor obtenido con el análisis de enriquecimiento, se obtuvo una visualización gráfica de los resultados, gracias a la herramienta informática REVIGO (www.revigo.irb.hr, versión Enero 2017) (Supek et al. 2011).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Ensayo LC-MS/MS

4.1.1. Reproducibilidad

En el Anejo I se incluye la tabla resumen del ensayo de reproducibilidad y las figuras con las distribuciones de los CV de las intensidades de los péptidos, y de las intensidades (e intensidades LFQ) de las proteínas identificadas en el ensayo de una muestra concreta por triplicado (**Anejo I, Tabla AI. 1, Figuras AI. 1 a AI. 3**). Tras el filtrado basado en el número de “MS/MS counts” y los valores de intensidad (o intensidad LFQ), la mediana del CV en la intensidad de los péptidos obtenida fue del 14,50 %, mientras que para las proteínas esta mediana fue de 17,41% y del 5,24% (en función de si se consideraba la intensidad o la intensidad LFQ).

Las medianas fueron inferiores al 20%, en especial al considerar la intensidad LFQ, lo que implica que las variaciones cuando se analiza una misma muestra son pequeñas. Estos son valores comunes y aceptables para un ensayo LC-MS/MS.

4.2 Análisis bioinformático de los archivos

4.2.1 Análisis estadístico

Un total de 1823 proteínas fueron identificadas al analizar los espectros por MaxQuant, de las cuales quedaron 1760 tras la depuración en base a los “MS/MS counts” y a las intensidades o intensidades LFQ. En la **Tabla 2** se puede observar el número de proteínas diferencialmente expresadas para cada comparación según el ANOVA realizado por el InfernoRDN (p-valor inferior a 0,05).

Tabla 2. Número de proteínas diferencialmente expresadas (con un p-value ANOVA inferior a 0,05) para cada comparación estudiada, teniendo en cuenta los valores de intensidad (columna de la izquierda) o de intensidad “Label-Free Quantification” (LFQ; columna de la derecha).

COMPARACIONES	Nº de proteínas diferencialmente expresadas (p-valor <0,05)	
	Intensidad	Intensidad LFQ
F1 vs F2 vs VF1 vs VF2	99	84
F1 vs F2+VF1+VF2	83	54
F2 vs F1+VF1+VF2	117	133
VF1 vs F1+F2+VF2	105	90
VF2 vs F1+F2+VF1	193	79
F1+VF1 vs F2+VF2	108	150
F1 vs F2	81	63
F1 vs VF1	97	52
F1 vs VF2	69	59
F2 vs VF1	137	141
F2 vs VF2	97	54
VF1 vs VF2	235	143

Como podía esperarse, cuando se considera la intensidad LFQ, el número de proteínas con un p-valor inferior a 0,05 es generalmente menor, puesto que se trata de un valor de intensidad normalizado. Tal y como se indica en el apartado 3.8, sólo las comparaciones de interés (**F1 vs F2**, **F1 vs VF1**, **F2 vs VF2** y **F1 vs F2 vs VF1 vs VF2**) se sometieron al posterior filtrado con Microsoft Excel y al análisis funcional.

4.2.1.1 HeatMap y ACP

Los gráficos *HeatMap* y el ACP en base a las proteínas diferencialmente expresadas de la comparación **F1 vs F2**, **F1 vs VF1** y **F2 vs VF2** se recoge en el Anejo II. Los resultados del ACP (Anejo II, Figuras AII. 1, AII. 3 y AII. 5 respectivamente) y del “clustering” representado con el *HeatMap* (Anejo II, Figuras AII. 2, AII. 4 y AII. 6 respectivamente), para estas comparaciones, fueron los esperados, apareciendo las muestras de cada población experimental agrupadas en el mismo “cluster” en todas las comparaciones.

Al comparar todos los grupos entre sí, **F1 vs F2 vs VF1 vs VF2**, el ACP (Figura 8) revela que la primera componente principal (CP1; 38,7% de la variabilidad) separa las muestras **VF2** del resto de muestras, mientras que la segunda componente principal (CP2; 17,6 % de la variabilidad) separa las dos generaciones (generación 1 y generación 2). Cuando analizamos el *HeatMap* (Figura 9), las muestras quedan agrupadas en dos “clusters”, uno compuesto por las muestras **F1**, **F2** y **VF1** y el otro por las muestras **VF2**, aunque existen dos muestras (F1-2 y VF2-4) que no se agrupan junto al resto de muestras de su mismo grupo.

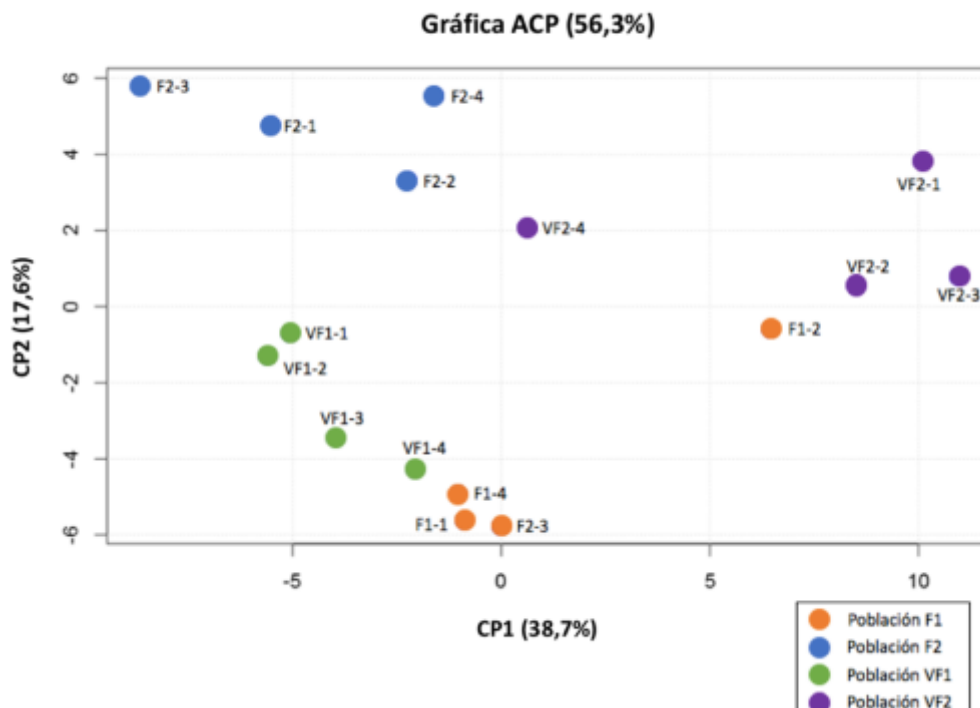


Figura 8. Gráfico de dispersión obtenido a partir del Análisis de Componentes Principales (ACP) de las proteínas diferencialmente expresadas en la comparación **F1 vs F2 vs VF1 vs VF2**. La primera componente principal (CP1; 38,7% de la variabilidad) separa las muestras del grupo **VF2** del resto de grupos, y la segunda componente principal (CP2; 17,6% de la variabilidad) separa las muestras de la **generación 1** de las de la **generación 2**.

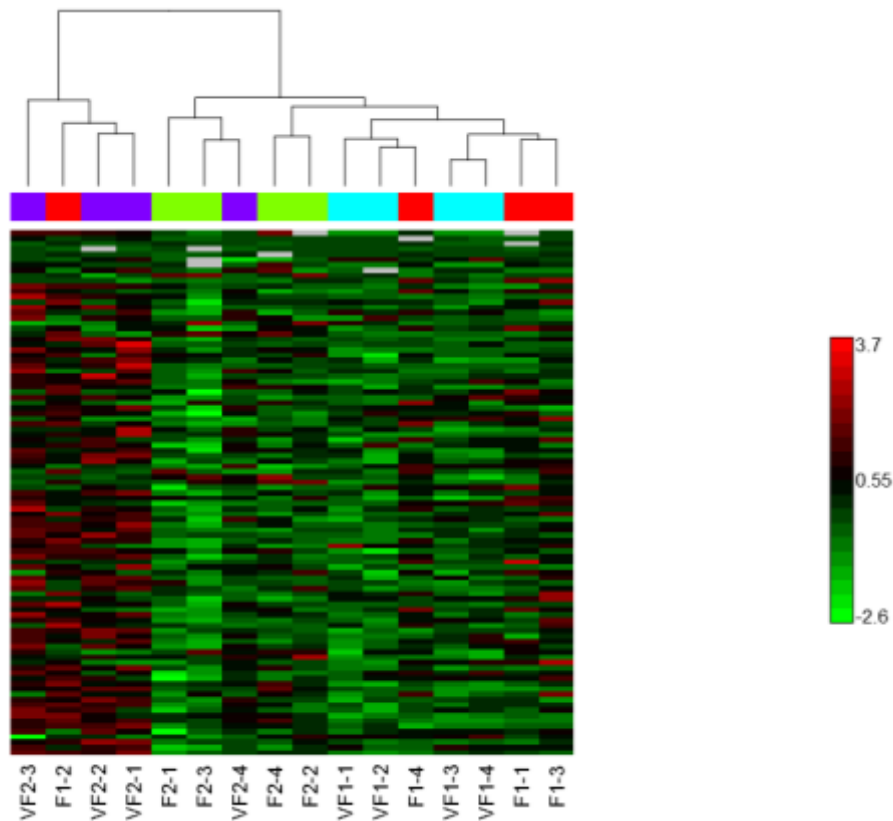


Figura 9. Heatmap obtenido con el clustering de las muestras de la comparación **F1 vs F2 vs VF1 vs VF2** en base a las proteínas diferencialmente expresadas en la misma comparación

4.2.1.2 HeatMap y ACP

Por un lado, en la **Tabla 3** se recoge el número de proteínas que permanecen en cada comparación de interés tras las reglas de filtrado que aparecen en el punto 3.7.3, indicando cuántas de ellas están sobreexpresadas en cada grupo de la comparación (al tratarse de comparaciones de dos grupos, hay que tener en cuenta que aquellas proteínas sobreexpresadas en un grupo están infraexpresadas en el otro, y viceversa) y cuántas sólo se detectan en uno de las poblaciones experimentales. Y, por otro lado, el Anejo III recoge las tablas (**Tabla AIII. 1** a **AIII. 3**) que incluyen el listado de estas proteínas (las que permanecen tras el filtro), junto con el p-valor obtenido con ANOVA, el FC de las intensidades promedio y el valor del estadístico T. Estos listados son los utilizados para el análisis funcional. Solo se incluyen los listados de las comparaciones **F1 vs F2**, **F1 vs VF1** y **F2 vs VF2**. El de la comparación de todos grupos (**F1 vs F2 vs VF1 vs VF2**) no se incluye, puesto que no se realizó el análisis funcional de las proteínas que diferían en esta comparación, al no aportar información relevante.

Tabla 3. Número de proteínas sobreexpresadas en los grupos de cada comparación, considerando intensidad o intensidad LFQ.

	NÚMERO DE PROTEÍNAS	
	Intensidad	Intensidad LFQ
F1 vs F2	55 47(2) vs 8(1)	14 8(2) vs 6(1)
F1 vs VF1	59 52(4) vs 7(1)	19 13(5) vs 6(1)
F2 vs VF2	68 8(3) vs 60(1)	9 1 vs 8(2)
F1 vs F2 vs VF1 vs VF2^a	44	14

*En la tabla se enfrentan dos números, donde cada uno se corresponde al número de proteínas sobreexpresadas en el grupo correspondiente de la comparación en cuestión.

Entre paréntesis se indica cuántas de ellas lo están porque en el otro grupo de la comparación la intensidad (o intensidad LFQ) de todas las muestras era nula. Por ejemplo: en la comparación **F1 vs VF1**, de las 52 proteínas sobreexpresadas en el grupo F1, 4 de ellas no se detectaron en ninguna muestra de **VF1**.

^aPara la comparación **F1 vs F2 vs VF1 vs VF2** solo se indica el número de proteínas que permanecen tras el filtrado.

El número proteínas diferencialmente expresadas cuando se comparan las intensidades es mayor que cuando se comparan las intensidades LFQ. La comparación **F2 vs VF2**, que es la que más proteínas diferencialmente expresadas presenta, es también la más afectada por la normalización de la intensidad, ya que la reducción del número de proteínas es mayor. Por otro lado, a pesar de la reducción del número de proteínas diferencialmente expresadas, la población experimental que registra un mayor número de proteínas sobreexpresadas en cada comparación no varía, independientemente de si se considera la intensidad o la intensidad LFQ. Es decir, en la comparación **F1 vs VF1** es la población **F1** la que presenta, tanto en intensidad como en LFQ un mayor número de proteínas sobreexpresadas (52 y 13, respectivamente). Lo mismo ocurre con el resto de comparaciones.

A partir de la información recogida en las tablas del Anejo III (**Tabla AIII. 1 a AIII. 3**), se obtiene la **Tabla 4**. En esta, se recogen los porcentajes de las proteínas diferencialmente expresadas en base a si 1) presentan un FC significativo (superior o igual a 1 o inferior o igual a -0,5), 2) presentan diferencias significativas tanto en los valores de intensidad como en los de intensidad LFQ (p-valor ANOVA menor a 0,05) y 3) ambas intensidades presentan p-valores menores de 0,05 y, además, si el FC es significativo (superior o igual a 1 o inferior o igual a -0,5).

Tabla 4. Porcentaje de proteínas, que estando diferencialmente expresadas por la comparación de los valores de intensidad: presentan un FC significativo, también se encuentran diferencialmente expresadas al comparar los valores de LFQ y, de las que coinciden con LFQ, las que presentan un FC significativo.

	F1 vs F2	F1 vs VF1	F2 vs VF2
% de proteínas con FC significativo^a	33	42	47
% de proteínas que están diferencialmente expresadas al comparar la intensidad y la intensidad LFQ^b	10,9	10,1	4,4
% de proteínas diferencialmente expresadas al comparar ambas intensidades y con un FC significativo^c	33,3	83,3	33,3

^a Proteínas que presentan un FC superior o igual a 1 o inferior o igual a -0,5.

^b Proteínas que se encuentran diferencialmente expresadas (p-valor<0.05) tanto al comparar la intensidad como al comparar la intensidad LFQ.

^c De las proteínas que se encuentran diferencialmente expresadas al comparar los dos tipos de intensidades (p-valor<0.05), aquellas que presentan un FC significativo.

La comparación **F2 vs VF2** sería la que presenta más proteínas, respecto al total de las diferencialmente expresadas (p-valor inferior a 0,05), con un FC significativo (47%), seguida de **F1 vs VF1** (42%) y de **F1 vs F2** (33%). Pero al considerar cuántas proteínas se mantienen diferencialmente expresadas independientemente de la intensidad comparada (intensidad o intensidad LFQ), **F2 vs VF2** pasa a ser la que menos tiene (4,4%), estando **F1 vs F2** y **F1 vs VF1** en una posición similar (10,9% y 10,1% respectivamente). De nuevo, la situación cambia si se tienen en cuenta los dos aspectos (las proteínas diferencialmente expresadas tanto al comparar la intensidad como la intensidad LFQ y de estas, las que tienen un FC significativo), pasando a ser **F1 vs VF1** la comparación que más proteínas presenta (83,3%).

4.3 Análisis funcional

Tal y como se indica en el apartado 3.9, se utilizó la herramienta BLAST para obtener el identificador de la proteína humana más similar para cada proteína de conejo identificada. Se pudo obtener para todas las proteínas, excepto para una: G1TFX3 (5-hidroxisourato hidrolasa; UniProtKB - G1TFX3 (G1TFX3_RABIT)).

Cuando se analizaron qué proteínas eran específicas de cada población, el diagrama de Venn (**Figura 10**) mostró que la mayor parte de las proteínas diferencialmente expresadas solo están en una de las tres comparaciones, es decir, que hay pocas proteínas compartidas entre las comparaciones. Aun así, hay proteínas compartidas, siendo el efecto de la generación y el transgeneracional de la criopreservación las que más comparten y los efectos de la criopreservación los que menos.

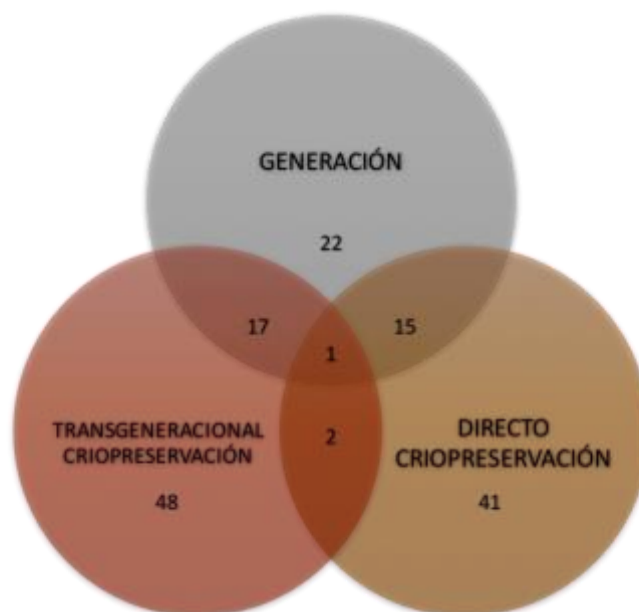


Figura 10. Diagrama de Venn generado con la comparación de los listados de proteínas diferencialmente expresadas para los tres efectos analizados: directo de la criopreservación, transgeneracional de la criopreservación y generación. Los efectos de la generación y el directo de la criopreservación comparten diez proteínas diferenciales; la generación y el transgeneracional de la criopreservación comparten quince; el directo y el transgeneracional de la criopreservación comparten solamente una; y los tres efectos también comparten solamente una

Los procesos biológicos y las funciones moleculares en los que participan las proteínas de cada listado son diversos. Sin embargo, de acuerdo con el análisis de los términos GO utilizando la herramienta Panther, los procesos metabólicos (**F1 vs F2** 41%; **F1 vs VF1** 28%; **F2 vs VF2** 46%) y los celulares (**F1 vs F2** 25%; **F1 vs VF1** 28%; **F2 vs VF2** 23%) son los procesos más representados en las tres comparaciones. En la categoría de funciones moleculares, por su parte, destacan la actividad catalítica (**F1 vs F2** 57%; **F1 vs VF1** 50%; **F2 vs VF2** 53%) y la unión (**F1 vs F2** 29%; **F1 vs VF1** 30%; **F2 vs VF2** 29%). En general, las tres comparaciones presentan porcentajes similares en ambas categorías, a excepción de los procesos metabólicos en la comparación **F1 vs VF1**, que presenta un porcentaje relativamente menor al resto.

En el Anejo IV se incluyen los gráficos circulares proporcionados por Panther sobre estas categorías GO evaluadas (“Procesos biológico” y “Función Molecular”) para cada comparación (**F1 vs F2**, **F1 vs VF1** y **F2 vs VF2**, **Figura AIV. 1 a AIV. 6**), mientras que los resultados obtenidos con DAVID se recogen en el Anejo V (**Tablas AV. 1 a AV. 6**). En estas, correspondientes a cada comparación y a las dos categorías GO consideradas, se incluye el término GO significativamente (p-valor inferior a 0,05) representado en la lista, su descripción, su p-valor, el número de proteínas con este término asociado, además del % que representan del total de proteínas del listado.

Las figuras generadas mediante REVIGO (**Figuras 11 y 12**) permiten visualizar qué procesos y funciones se encuentran más enriquecidas en cada conjunto de proteínas. De estos gráficos, por un lado, cabe destacar que, mientras que cada caja representa un

término GO, el tamaño de la misma representa el p-valor introducido, de forma que cuanto más grande sea la caja menor será el p-valor de ese término, y, por tanto, mayor será la significancia de su enriquecimiento en el listado. Y, por otro lado, que cada color agrupa diferentes términos GO en una categoría superior

Observando los procesos biológicos (**Figura 11**), los términos GO enriquecidos por el paso de una generación a otra se relacionan principalmente con la respiración y el metabolismo; los enriquecidos por el efecto directo de la criopreservación principalmente están involucrados en el metabolismo lipídico y en la respuesta a xenobióticos; y las modificadas por el efecto transgeneracional participan en el metabolismo del glioxilato y en el procesamiento del RNA ribosomal (rRNA).

Un aspecto a destacar es que el metabolismo del glioxilato está enriquecido en la comparación **F2 vs VF2**, ya que se trata de una ruta conocida por estar presente en bacterias, hongos, algunos protistas y plantas (Kondrashov et al. 2006), pero no en animales. Al introducir los identificadores de las proteínas que con se asocian a esta ruta (Q9BYV1, Q02218, P21953) en UniProt, estas son proteínas humanas con actividades transaminasa y deshidrogenasa y con funciones relacionadas con procesos comunes en humanos, como regular la presión sanguínea. Pero, dado que estas proteínas son las homólogas a las que en estos seres vivos se encargarían del metabolismo del glioxilato, este proceso aparece enriquecido, aunque realmente no lo está. Al eliminar el término GO "Glyoxylate metabolism" de los datos introducidos en REVIGO, esta categoría desaparece, y los términos que englobaba pasan a ser englobados por el procesamiento de rRNA (datos no mostrados).

Finalmente, si se consideran las funciones moleculares (**Figura 12**), por el efecto de la criopreservación (sea directo o transgeneracional) se encuentran enriquecidos los términos GO asociados a la actividad transaminasa. Otra función diferencial por el efecto directo es la actividad vitamina D hidroxilasa, mientras que la unión al piridoxal fosfato lo está por el efecto transgeneracional. Por último, en cuanto al efecto el paso de una generación a otra, los principales términos GO enriquecidos se relacionan con la actividad coenzima-A(CoA) ligasa, así como con las catalíticas.



Figura 11. Términos GO de la categoría “Proceso biológico” enriquecidos en el listado de proteínas diferencialmente expresadas por **A)** el efecto de la generación (**F1 vs F2**); **B)** el efecto directo de la criopreservación (**F1 vs VF1**); **C)** el efecto transgeneracional de la misma (**F2 vs VF2**).



Figura 12. Términos GO de la categoría “Función molecular” enriquecidos en el listado de proteínas diferencialmente expresadas por **A)** el efecto de la generación (**F1 vs F2**); **B)** el efecto directo de la criopreservación (**F1 vs VF1**); **C)** el efecto transgeneracional de la misma (**F2 vs VF2**).

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 Reproducibilidad del ensayo

A pesar de las ventajas que supone el empleo de la estrategia de cuantificación seguida, “label-free”, la variabilidad inter-muestral es mayor en comparación con las estrategias que emplean marcaje, ya que las muestras se preparan y analizan por separado (Bantscheff et al. 2012; Lindemann et al. 2017). De hecho, en el ensayo de reproducibilidad se observa que las muestras presentan variaciones entre sí, aunque estas son aceptables (17,4 y 5.2% en base a la intensidad y LFQ, respectivamente). Como consecuencia de esta variabilidad, es posible que algunas diferencias con bajos FC sean atribuibles a la variabilidad del equipo. Para minimizar este efecto, se aplicaron los filtros descritos en el punto 3.7.3, eliminando las proteínas que, con p-valores inferiores a 0,05, diferían entre grupos con una menor magnitud o consistencia. Por otro lado, se puede aumentar aún más la fiabilidad de los resultados cuando estos se basan en las intensidades LFQ, ya que este es un valor normalizado y que, por tanto, solo aquellas diferencias más fuertes se mantienen en la comparación de estos valores.

La robustez del análisis cuantitativo, en base a los FC y las intensidades LFQ (**Tabla 4**), para las comparaciones realizadas fue similar, siendo, en general, más elevada cuando se compararon los grupos experimentales **F1** y **VF1** (es la comparación que presenta el mayor porcentaje de proteínas con un FC significativo y que se encuentran alteradas independientemente de la intensidad comparada; 83,3%). Esto implica que los cambios de expresión detectados en **VF1** (respecto a **F1**) son más seguros que los detectados en **F2** o en **VF2** (en comparación con las poblaciones **F1** y **F2**, respectivamente).

5.2 Análisis estadístico

En diferentes estudios se ha comprobado que un cambio inducido en el estado embrionario de los progenitores, como por ejemplo la exposición de estos a metilmercurio (MeHg) o a procedimientos como la criopreservación, pueden afectar a la descendencia (Carvan et al. 2017; Lavara et al. 2014). Por otro lado, el impacto sobre los animales que en su fase embrionaria han sido sometidos algún tipo de manipulación está igualmente demostrado. Este impacto es especialmente marcado en la fase pre-natal (Saenz-De-Juano et al. 2014; Vicente et al. 2013), aunque también en el momento del nacimiento (Zernicka-Goetz et al. 2009) o incluso en el individuo adulto (Lavara et al. 2015). No obstante, la comparación de los resultados obtenidos en este estudio es compleja ya que no hay estudios similares previos. En este estudio lo que se observa es que los descendientes de animales que han sido sometidos a crioconservación presentan un proteoma más diferencial, lo que

sugiere un claro efecto transgeneracional de la criopreservación, incluso con mayor impacto que la propia criopreservación sobre el embrión. Específicamente, este grupo (**VF2**) presentó un mayor número diferencial de proteínas (n=68) en comparación con el resto de grupos (n=55 y n=59 para **VF1** y **F2** respectivamente).

5.3 Análisis funcional

En el diagrama Venn se puede observar que los efectos que más proteínas afectadas comparten son la generación y el efecto transgeneracional de la criopreservación. No obstante, si se consideran los valores FC individuales de las proteínas compartidas, las diferencias no fueron significativas. Además, de las 59 proteínas diferenciales observadas, únicamente 2 son confirmados tanto en la población **VF1** como en su descendencia, **VF2**. Estas proteínas son Q9BY49 (trans-2-enoil-CoA reductasa peroxisomal o PERC; UniProtKB - Q9BY49 (PECR_HUMAN)) y O95865 (N(G),N(G)-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2 o DDAH-2; UniProtKB - O95865 (DDAH2_HUMAN)). Por un lado, está PERC, proteína implicada en la elongación de los ácidos grasos (UNIPROT CONSORTIUM, 2017), la cual se encuentra infraexpresada en **VF1** respecto a **F1** (FC -0,3) y sobreexpresada en **VF2** respecto a **F2** (FC 0,5). Además, también está afectada por el efecto del paso de una generación a otra (infraexpresada en **F2**, FC -0,4). En base a estas observaciones, si PERC se reduce por efecto de la criopreservación y de la generación, en **VF2** (en la que se acumulan los dos efectos), la reducción debería ser mayor. No obstante, este efecto no se produce, y además sus FC fueron bajos (no son superiores a 1 o inferiores a -0,5), y la proteína no se encontró modificada en base a la intensidad LFQ. Por tanto, se podría considerar que esta diferencia no parece ser relevante.

Por otro lado, DDAH-2 se encuentra en una situación más o menos similar a la PERC. Concretamente, DDAH-2 aparece sobreexpresada en **VF1** respecto a **F1** (FC 0,8), pero infraexpresada en **VF2** respecto a **F2** (FC -0,5). Sin embargo, en la comparación **F1 vs F2** no se expresa diferencialmente (p-valor en ANOVA superior a 0,05). Esto implica que, la criopreservación altera la síntesis de esta proteína no sólo en el embrión manipulado sino también en su descendencia, aunque lo hace de una forma diferente. DDAH-2 se encarga de hidrolizar un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS) (UNIPROT CONSORTIUM, 2017), por lo que tiene un papel importante en la generación de óxido nítrico (NO). Considerando que un incremento en NO (que podría estar inducido por el aumento de una enzima como DDAH-2, la cual elimina inhibidores de NOS) se puede asociar a un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Aliancy et al. 2017), esto implicaría que la criopreservación podría tener un efecto sobre la producción de ROS. En un estudio similar a este, se detectó la sobreexpresión de un gen relacionado con la producción de NO (NOSTRIN, transportador de NOS, con un FC 6,9) en la placenta fetal de conejos que habían sido vitrificados en su

fase embrionaria (Saenz-De-Juano et al. 2014). Por tanto, la criopreservación podría modificar el metabolismo relacionado con el estrés oxidativo.

- Efecto del paso de una generación a otra

En esta comparación se compararon los individuos de las poblaciones control (**F1** y **F2**), en lo que *a priori* no eran esperables diferencias. Sin embargo, los resultados indican que esto no es así, sino que hay variaciones significativas. Por un lado, está la recombinación y el cruzamiento de los gametos, lo cual aporta variabilidad a los individuos. Y, por otro lado, está la variación ambiental ya que se están comparando generaciones no coetáneas, es decir, individuos que no compartieron las condiciones ambientales al estar en periodos diferentes. No obstante, la variabilidad observada entre ambas poblaciones fue menor que la provocada por la criopreservación. Concretamente, la comparación entre las poblaciones **F1** y **F2** fue la que menos proteínas diferenciales presenta, solo un 33% de ellas presentaron FC significativos y de estas, pocas se mantienen diferenciales al comparar las intensidades LFQ.

- Efecto directo de la criopreservación en la generación 1

Con el trabajo de Redondo (2014), los procesos afectados por el efecto de la vitrificación están principalmente relacionados con el metabolismo, lo que se corresponde con los resultados obtenidos mediante Panther en este trabajo. En este estudio se observó que estos procesos se relacionan con el metabolismo lipídico y con la respuesta al etanol (la cual básicamente se corresponde con el metabolismo de xenobióticos). Las proteínas asociadas a estos procesos, en su gran mayoría, se encuentran infraexpresadas en el grupo **VF1**, y presentan FC, por lo general, significativos (FC inferior a 0,5). Además, es importante destacar que algunas de las proteínas participantes de estos procesos, concretamente P33260 y P08684 (homoproteínas de la superfamilia citocromo P450 caracterizadas por actuar como monooxigenasas (Coelho-França-Quintanilha et al. 2017)) y P16152 (carbonil reductasa 1, CBR-1, caracterizada por reducir compuestos carbonilo (Gonzalez-Covarrubias et al. 2008)), también se mantienen diferenciales al comparar las intensidades LFQ. Estos resultados van en línea con dos estudios anteriores, observando alteraciones como consecuencia de la vitrificación embrionaria a nivel transcritoómico (comunicación personal) y proteómico (Redondo 2014). A pesar de que en el estudio del transcriptoma, los genes que se relacionaron con el metabolismo lipídico se encontraban sobreexpresados y no infraexpresados, esto podría deberse al hecho de que los niveles de mRNA detectados no siempre coinciden con los de proteína (Karpievitch et al. 2010) como consecuencia de las modificaciones post-traduccionales que estas sufren. De todas formas, que la alteración del metabolismo lipídico se haya encontrado en el presente estudio, así como en anteriores (Redondo 2014, comunicación personal), podría estar relacionado con la reducción del 10%

del peso del hígado en individuos provenientes de embriones criopreservados (Lavara et al. 2015).

En relación con el metabolismo lipídico, el término GO relacionado con los procesos de oxidación-reducción (REDOX; GO:0055114), es el que más proteínas representa (12) y uno de los que presenta p-valores del enriquecimiento más pequeños ($2,8E-6$). En Redondo (2014) estos procesos también eran uno de los principalmente alterados, lo que concuerda con la bibliografía actual, la cual afirma que el proceso de cambios bruscos de temperatura de la célula aumenta la producción de ROS, los cuales terminan alterando las funciones y el estado redox celular (Bakala et al. 2012).

Centrándose en las funciones moleculares afectadas, las proteínas relacionadas con la función de unión fueron las que mostraron una mayor representación, coincidiendo de nuevo con los resultados de Redondo (2014). Por otro lado, la actividad oxidoreductasa también fue una de las principales funciones modificadas, lo que está en concordancia con que los procesos REDOX sean unos de los que se encuentran afectados.

Por último, de las proteínas afectadas por el efecto directo de la criopreservación, hay que resaltar a CBR-1 por ser un caso de presencia-ausencia, de forma que su expresión en el grupo control fue muy elevada, pero nula en todas las muestras de **VF1**. CBR-1 se encarga de catalizar la reducción de una variación bastante amplia de compuestos carbonilos (Gonzalez-Covarrubias et al. 2008). La supresión o la reducción de la expresión de esta proteína se ha asociado a malos pronósticos en diferentes tipos de tumores (Murakami et al. 2012; Osawa et al. 2015). Esto puede llevar a pensar que la ausencia de expresión detectada en este grupo podría aumentar la probabilidad de que estos individuos terminasen desarrollando algún tipo de tumor. No obstante, estudios más centrados en este aspecto serían necesarios para poder establecer una relación.

- Efecto transgeneracional de la criopreservación en la generación 2

El impacto transgeneracional que tiene un cambio ambiental en los progenitores sobre su descendencia se ha descrito en otros estudios. Lavara et al. (2014) demostraron que la criopreservación de embriones de conejo aumentaba el tamaño de camada y el número de gazapos vivos al nacer tanto en la descendencia directa de los embriones manipulados como en la siguiente generación. Por eso no es de extrañar que en esta comparación (**F2 vs VF2**) los perfiles proteicos hayan sido diferentes. Que características adquiridas por una generación, como consecuencia de la exposición a un agente o a un procedimiento, se hereden en las siguientes generaciones no expuestas, implica que hay algo más detrás del DNA afectando al fenotipo del individuo (Sharma 2014; Wei et al. 2015). Así aparece el término marca epigénética, definido como una modificación molecular sobre el DNA y/o sobre las proteínas asociadas al mismo que es estable durante largos periodos

de tiempo y que puede afectar a la expresión génica (Duffié et al. 2014; Wei et al. 2015). Dado que en mamíferos el desarrollo de los gametos ocurre durante el desarrollo fetal, si es el embrión el expuesto, en este caso, al procedimiento de la criopreservación, este puede adquirir marcas epigenéticas (Ho and Burggren 2010) que tengan consecuencias tanto en el individuo adulto como en su descendencia.

La presencia de proteínas específicamente diferenciales en la población **VF2** (48 de las 68 modificadas en **VF2** respecto a **F2** se encuentran sólo diferenciales en **VF2**) probablemente se debe a que los cambios observados en los individuos **VF1** se haya producido por un efecto directo de la criopreservación sobre las células de la línea somática, el cual es diferente al efecto que tiene sobre las células de la línea germinal (que es el que dará lugar a los cambios transgeneracionales observados en **VF2**). Esta hipótesis podría explicar la expresión diferencial de DDAH-2 con una sobreexpresión en **VF1** y una infraexpresión en **VF2**. Por otro lado, si se considera que casi la mitad de las proteínas específicas presentan un FC consistente (44% aproximadamente), estas podrían ser la razón de que **VF2** sea la población que presenta un proteoma más diferente y de que, como consecuencia, el efecto transgeneracional tenga un impacto sobre el embrión mayor al esperado. Teniendo en cuenta los procesos biológicos a los que se asocian estas proteínas específicas, destacan los relacionados con el metabolismo de aminoácidos y de lípidos, la respiración celular y la traducción de proteínas, así como las funciones moleculares de unión y catalíticas asociadas a dichos procesos. Las implicaciones biológicas de estas alteraciones pueden ser muy diferentes. Por ello, para entenderlas mejor, sería necesario realizar un nuevo experimento más amplio, y no solo a nivel del proteoma, sobre las poblaciones **F2** y **VF2**, así como un análisis del proteoma hepático en la siguiente generación (**F3** y **VF3**), que permitiese observar si estas modificaciones se mantienen en el tiempo.

Al considerar qué proteínas diferenciales por el efecto directo de la criopreservación se mantienen también diferenciales por el efecto transgeneracional, ya se ha visto que son dos: PERC y DDAH-2. En cuanto a los procesos biológicos y funciones moleculares, en base a los resultados de Panther, los principales procesos y funciones afectados en la población **VF2** coinciden tanto con los afectados en **VF1** como con los afectados en **F2**. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos con REVIGO, las coincidencias se concretan, estando los procesos REDOX, el metabolismo lipídico y las funciones moleculares relacionadas con la actividad transaminasa afectados en ambas poblaciones (**VF1** y **VF2**). En los tres casos se da una situación similar, y es que el efecto directo, de forma general, infraexpresa las proteínas asociadas a los procesos REDOX, al metabolismo lipídico y a la actividad transaminasa en la población **VF1**, y el transgeneracional, de forma general, las sobreexpresa en **VF2**. Los FC en la comparación **F1 vs VF1** presentan valores mayores en comparación con los FC de **F2 vs VF2**. Por ello, estas coincidencias pierden significancia.

Por último, teniendo en cuenta las proteínas de una forma más individual y no tanto a nivel de término GO, en ambas comparaciones (**F1 vs VF1** y **F2 vs VF2**) aparece la actividad UDP-glucosiltransferasa (UGT) afectada. En la comparación **F1 vs VF1** se encuentran P35503 y P06133 (UDP-glucuronosiltransferasa 1-3 o UGT1A3 y UDP-glucuronosiltransferasa 2B4 o UGT2B4, respectivamente) infraexpresadas en el grupo **VF1**. Por otro lado, en la comparación **F2 vs VF2** se encuentra P19224 (UDP-glucuronosiltransferasa 1-6 o UGT1A6) infraexpresada en **VF2**. De esta coincidencia cabe destacar que el FC en la comparación **F1 vs VF1**, tanto para UGT1A3 como para UGT2B4, tiene un valor cercano a -0,5, mientras que en **F2 vs VF2** el FC de UGT1A6 está cerca de -0,9. Esto significa que la criopreservación tiene el mismo efecto sobre ambas generaciones, pero que la magnitud sobre la **generación 2** es mayor que sobre la **generación 1**. Las UGT catalizan la reacción de glucoronidación de muchos compuestos exógenos (Alonen et al. 2008), siendo una de las principales reacciones por las que se eliminan los xenobióticos (Ritter 2000). Considerando su función, y que los crioprotectores empleados durante la criopreservación se consideran como xenobióticos para los embriones, puede que la alta concentración de crioprotectores a los que se someten los mismos activa este mecanismo, preparando al individuo adulto contra exposiciones a xenobióticos posteriores.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, el proceso de criopreservación embrionaria podría estar modificando los procesos relacionados con el estrés oxidativo (procesos REDOX) tanto en los individuos de forma directa como a su descendencia. No obstante, sería necesario realizar un nuevo estudio sobre la siguiente generación para poder confirmar estos efectos transgeneracionales.

7. REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

- AKSU, D.A.; AGCA, C.; AKSU, S.; BAGIS, H.; AKKOC, T.; CAPUTCU, A.T.; ARAT, S.; TASKIN, A.C.; KARSAHIN, T.; AKYOL, N.; SATILMIS, M.; SAGIRKAYA, H.; USTUNER, B.; NUR, Z. Y AGCA, Y. (2012). "Gene Expression Profiles of Vitrified in Vitro- and in Vivo-Derived Bovine Blastocysts." *Molecular Reproduction and Development*. 79 613-625. DOI 10.1002/mrd.22068
- ALIANCY, J.; STAMER, W.D. Y WIROSTKO, B. (2017). "A Review of Nitric Oxide for the Treatment of Glaucomatous Disease." *Ophthalmology and Therapy*. DOI: 10.1007/s40123-017-0094-6
- ALONEN, A.; FINEL, M. Y KOSTIAINEN, R. (2008). "The Human UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A3 Is Highly Selective towards N2 in the Tetrazole Ring of Losartan, Candesartan, and Zolarsartan." *Biochemical Pharmacology*. 76: 763-772. DOI 10.1016/j.bcp.2008.07.006
- ARYAL, U. K.; XIONG, Y.; MCBRIDE, Z.; KIHARA, D.; XIE, J.; HALL, M. C. Y SZYMANSKI, D. B. (2014). "A Proteomic Strategy for Global Analysis of Plant Protein Complexes." *The Plant Cell*. 26: 3867-3882. DOI 10.1105/tpc.114.127563
- ARYAL, U.K. Y SHERMAN, L.A. (2016). "Transcriptomic and Proteomic Analysis to Understand Systems-Level Properties of Diurnal Cycles in Nitrogen-Fixing Cyanobacteria." *Cyanobacteria Omics*.
- BAKALA, H.; HAMELIN, M.; MARY, J.; BOROT-LALOI, C. Y FRIGUET, B. (2012). "Catalase, a Target of Glycation Damage in Rat Liver Mitochondria with Aging." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1822: 1527-1534. DOI 10.1016/j.bbadis.2012.05.016.
- BANK, H. Y MAURER, R.R. (1974). "Survival of frozen rabbit embryos." *Experimental Cell Research*. 89: 188-196.
- BANTSCHOFF, M.; LEMEER, S.; SAVITSKI, M.M. Y KUSTER, B. (2012). "Quantitative Mass Spectrometry in Proteomics: Critical Review Update from 2007 to the Present." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 202: 939-965. DOI 10.1007/s00216-012-6203-4
- BESENFELDER, U. Y BREM, G. (1993). "Laparoscopic Embryo Transfer in Rabbits." *Journal of reproduction and fertility*. 99: 53-56.
- CARVAN, M.J.; KALLUVILA, T.A.; KLINGLER, R.H.; LARSON, J.K.; PICKENS, M.; MORA-ZAMORANO, F.X.; CONNAUGHTON, V.P.; SADLER-RIGGLEMAN, I.; BECK, D. Y SKINNER, M.K (2017). "Mercury-Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Abnormal Neurobehavior Is Correlated with Sperm Epimutations in Zebrafish." *Plos One*. 12: e0176155. DOI 10.1371/journal.pone.0176155
- COELHO-FRANÇA-QUINTANILHA, J.; MARCILIO-DE-SOUSA, V.; BERLOFA-VISACRI, M.; SAMPAIO-AMARAL, L.; MAIA-SANTOS, R.M.; ZAMBRANO, T.; SALAZAR, L.A. Y MORIEL, P. (2017). "Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity". *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. DOI 10.1007/s00280-017-3358-x
- COMISIÓN EUROPEA, UE (2013). "Séptimo Informe Sobre Las Estadísticas Relativas Al Número de Animales Utilizados Para Experimentación Y Otros Fines Científicos En Los Estados Miembros de La Unión Europea." Bruselas, 5.12.2013 COM(2013).
- COX, J. Y MANN, M. (2008). "MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized P.p.b.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification." *Nature biotechnology*. 26: 1367-1372. DOI 10.1038/nbt.1511

- COX, J.; HEIN, M. Y.; LUBER, C.A.; PARON, I.; NAGARAJ, N. Y MANN, M. (2014). "Accurate Proteome-Wide Label-Free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ." *Molecular & Cellular Proteomics*. 13: 2513-2526. DOI 10.1074/mcp.M113.031591
- DALCIN, L.; SILVA, R.C.; PAULINI, F.; SILVA, B.D.M.; NEVES, J.P. Y LUCCI, C.M. (2013). "Cytoskeleton Structure, Pattern of Mitochondrial Activity and Ultrastructure of Frozen or Vitrified Sheep Embryos." *Cryobiology*. 67: 137-145. DOI 10.1016/j.cryobiol.2013.05.012
- DENNIS JR, G.; SHERMAN, B.T.; HOSACK, D.A.; YANG, J.; GAO, W.; LANE, C.H. Y LEMPICKI, R.A. (2003). "DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery." *Genome Biology*. 4: R60. DOI 10.1186/gb-2003-4-9-r60
- DUFFIÉ, R.; AJJAN, S.; V.GREENBERG, M.; ZAMUDIO, N.; ESCAMILLA-DEL-ARENAL, M. Y IRANZO, J. (2014). "The Gpr1 / Zdbf2 Locus Provides New Paradigms for Transient and Dynamic Genomic Imprinting in Mammals." *Genes & development*. 28: 463-478. DOI 10.1101/gad.232058.113.4
- EDGAR, D.H. Y GOOK, D.A. (2012). "A Critical Appraisal of Cryopreservation (Slow Cooling versus Vitrification) of Human Oocytes and Embryos." *Human Reproduction Update*. 18: 536-554. DOI 10.1093/humupd/dms016
- FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIEBAHN, C.; SANTOS, A.N. Y DURANTHON, V. (2012). "Rabbit as a Reproductive Model for Human Health." *Reproduction*. 144: 1-10. DOI 10.1530/REP-12-0091
- GARCÍA, M. L. Y BASELGA, M. (2002). "Estimation of Genetic Response to Selection in Litter Size of Rabbits Using a Cryopreserved Control Population." *Livestock Production Science*. 74: 45-53. DOI 10.1016/S0301-6226(01)00280-9
- GONZALEZ-COVARRUBIAS, V.; KALABUS, J.L. Y BLANCO, J.G. (2008). "Inhibition of Polymorphic Human Carbonyl Reductase 1 (CBR1) by the Cardioprotectant Flavonoid 7-Monohydroxyethyl Rutoside (monoHER)." *Pharmaceutical research*. 27: 1730-1734. DOI 10.1007/s11095-008-9592-5
- HAKIMI, O.; TERNETTE, N.; MURPHY, R.; KESSLER, B.M. Y CARR, A. (2017). "A Quantitative Label-Free Analysis of the Extracellular Proteome of Human Supraspinatus Tendon Reveals Damage to the Pericellular and Elastic Fibre Niches in Torn and Aged Tissue." *Plos one*. 12: e0177656. DOI 10.1371/journal.pone.0177656
- HAN, X.; ASLANIAN, A. Y YATES, J.R. (2008). "Mass Spectrometry for Proteomics." *Current Opinion in Chemical Biology*. 12: 483-490. DOI 10.1016/j.cbpa.2008.07.024
- HO, D. H. Y BURGGREN, W. W. (2010). "Epigenetics and Transgenerational Transfer: A Physiological Perspective." *Journal of Experimental Biology*. 213: 3-16. DOI 10.1242/jeb.019752
- HOHN, H.P.; MOOTZ, U. Y DENKER, H.W. (1992). "Development of Rabbit Preimplantation Blastocysts Cultured with Precultured Endometrial Tissue." *Journal of reproduction and fertility*. 95: 409-420.
- KAMARUZAMAN, N.A.; KARDIA, E.; KAMALDIN, N.; LATAHIR, A.Z.; Y YAHAYA, B.H. (2013). "The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy". *Biomed Research International*. 69: 18-30. DOI 10.1155/2013/691830
- KARPIEVITCH, Y.V.; POLPITIYA, A.D.; ANDERSON, G.A.; SMITH, R.D. Y DABNEY, A.R. (2010). "Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects." *Annals of Applied Statistic*. 4: 1797-1823. DOI 10.1214/10-AOAS341
- KASAI, M. (1996). "Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos." *Animal Reproduction Science*. 42: 67-75.

- KATZ-JAFFE, M.G.; GARDNER, D.K. Y SCHOOLCRAFT, W.B. (2006). "Proteomic Analysis of Individual Human Embryos to Identify Novel Biomarkers of Development and Viability." *Fertility and Sterility*. 85: 101-107. DOI 10.1016/j.fertnstert.2005.09.011
- KATZ-JAFFE, M.G. Y GARDNER, D.K. (2007). "Embryology in the Era of Proteomics." *Theriogenology*. 68: 125-130. DOI 10.1016/j.theriogenology.2007.03.014
- KLEINHANS, F.W. Y MAZUR, P. (2007). "Comparison of Actual vs. Synthesized Ternary Phase Diagrams for Solutes of Cryobiological Interest." *Cryobiology*. 54: 212-222. DOI 10.1016/j.cryobiol.2007.01.007
- KONDRASHOV, F.A.; KOONIN, E.V; MORGUNOV, I.G.; FINOGENOVA, T.V. Y KONDRASHOVA, M.N. (2006). . "Evolution of Glyoxylate Cycle Enzymes in Metazoa: Evidence of Multiple Horizontal Transfer Events and Pseudogene Formation." *Biology direct*. 1: 1-14. DOI 10.1186/1745-6150-1-31
- KOVALCHUK, I. (2012). "Transgenerational Epigenetic Inheritance in Animals." *Frontiers in Genetics*. 3: 1-2. DOI 10.3389/fgene.2012.00076
- 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: 652-657. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.03.018
- LAVARA, R.; BASELGA, M.; MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VICENTE, J. S. (2014). "Long-Term and Transgenerational Effects of Cryopreservation on Rabbit Embryos." *Theriogenology*. 81: 988-992. DOI 10.1016/j.theriogenology.2014.01.030
- LAVARA, R.; BASELGA, M.; MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VICENTE, J.S. (2015). "Embryo Vitrification in Rabbits: Consequences for Progeny Growth." *Theriogenology*. 84: 674-680. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.04.025.
- LEIBO, S.P. (2008). "Cryopreservation of Oocytes and Embryos: Optimization by Theoretical versus Empirical Analysis." *Theriogenology*. 69: 37-47. DOI 10.1016/j.theriogenology.2007.10.006
- LINDEMANN, C.; THOMANEK, N.; HUNDT, F.; LERARI, T.; MEYER, H.E.; WOLTERS, D. Y MARCUS, K. (2017). "Strategies in Relative and Absolute Quantitative Mass Spectrometry Based Proteomics." *Biological Chemistry*. 398: 687-699. DOI 10.1515/hsz-2017-0104
- LUO, H.; DENG, Z.; LIU, L.; SHEN, L.; KOU, H.; HE, Z.; PING, J.; XU, D.; MA, L.; CHEN, L. Y WANG, H. (2014). . "Prenatal Caffeine Ingestion Induces Transgenerational Neuroendocrine Metabolic Programming Alteration in Second Generation Rats." *Toxicology and Applied Pharmacology*. 274: 383-392. DOI 10.1016/j.taap.2013.11.020
- MAMO, S.; BODO, S.; KOBOLAK, J.; POLGAR, Z.; TOLGYESI, G. Y DINNYES, A. (2006). "Gene Expression Profiles of Vitrified in Vivo Derived 8-Cell Stage Mouse Embryos Detected by High Density Oligonucleotide Microarray." *Molecular Reproduction and Development*. 73: 1380-1392. DOI 10.1002/mrd.20588
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; LAVARA, R.; JIMÉNEZ-TRIGOS, E. Y VICENTE, J. S. (2013). "In Vivo Development of Vitrified Rabbit Embryos: Effects of Vitrification Device, Recipient Genotype, and Asynchrony." *Theriogenology*. 79: 1124-1129. DOI 10.1016/j.theriogenology.2013.02.008
- MAZUR, P. (1963). "Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing." *The Journal of General Physiology*. 47: 347-369.
- MI, H.; MURUGANUJAN, A. Y THOMAS, P.D. (2013). "PANTHER in 2013: Modeling the Evolution of Gene Function, and Other Gene Attributes, in the Context of Phylogenetic Trees." *Nucleic Acids Research*. 41: 377-386. DOI 10.1093/nar/gks1118

- MOCÉ, M. L.; BLASCO, A. Y SANTACREU, M. A. (2010). "In Vivo Development of Vitrified Rabbit Embryos: Effects on Prenatal Survival and Placental Development." *Theriogenology*. 73: 704-710. DOI 10.1016/j.theriogenology.2009.11.010
- MUKAIDA, T. Y OKA, C. (2012). "Vitrification of Oocytes, Embryos and Blastocysts." *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 26: 789-803. DOI 10.1016/j.bpobgyn.2012.07.001
- MURAKAMI, A.; YAKABE, K.; YOSHIDOMI, K.; SUEOKA, K.; NAWATA, S.; YOKOYAMA, Y., TSUCHIDA, S.; AL-MULLA, F. Y SUGINO, N. (2012). Decreased Carbonyl Reductase 1 Expression Promotes Malignant Behaviours by Induction of Epithelial Mesenchymal Transition and Its Clinical Significance." *Cancer Letters*. 323: 69-76. DOI 10.1016/j.canlet.2012.03.035
- NESVIZHSHKII, A.I.; VITEK, O. Y AEBERSOLD, R. (2007). "Analysis and Validation of Proteomic Data Generated by Tandem Mass Spectrometry." *Nature Methods*. 4: 787-797. DOI 10.1038/nmeth1088
- ONG, S.E. Y MANN, M. (2005). "Mass Spectrometry-based Proteomics Turns Quantitative." *Nature Chemical Biology*. 1: 252-262. DOI 10.1038/nchembio736
- OSAWA, Y.; YOKOYAMA, Y.; SHIGETO, T.; FUTAGAMI, M. Y MIZUNUMA, H. (2015). "Decreased Expression of Carbonyl Reductase 1 Promotes Ovarian Cancer Growth and Proliferation." *International Journal of Oncology*. 46: 1252-1258. DOI 10.3892/ijo.2014.2810
- PEREIRA, R.M. Y MARQUES, C.C. (2008). "Animal Oocyte and Embryo Cryopreservation." *Cell and Tissue Banking*. 9: 267-277. DOI 10.1007/s10561-008-9075-2
- POLGE, C.; SMITH, A.U. Y PARKES, A. S. (1949). "Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures." *Nature*. 164: 666.
- RALL, F. Y FAHY, W.F. (1985). "Cryopreservation of Mouse Embryos at -196 Degrees C by Vitrification." *Nature*. 313: 573-575.
- REDONDO, S. (2014). "Efecto de La Vitricación Embrionaria Sobre El Proteoma de Hígados de Conejo." Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología. Valencia, Julio 2014.
- RITTER, J.K. (2000). "Roles of Glucuronidation and UDP-Glucuronosyltransferases in Xenobiotic Bioactivation Reactions." *Chemico-Biological Interactions*. 129: 171-193.
- ROCHA, J.C.; PASSALIA, F.; MATOS, F.D.; MASERATI JR, M.P.; ALVES, M.F.; DE-ALMEIDA, T.G.; CARDOSO, B.L.; BASSO, A.C. Y NOGUEIRA, M.F.G. (2016). "Methods for Assessing the Quality of Mammalian Embryos: How Far We Are from the Gold Standard?" *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*. 20: 150-158. DOI 10.5935/1518-0557.20160033
- SAENZ-DE-JUANO, M.D.; MARCO-JIMENEZ, F.; SCHMALTZ-PANNEAU, B.; JIMENEZ-TRIGOS, E.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; PENARANDA, D. S.; JOUINEAU, L.; LECARDONNEL, J.; LAVARA, R.; NATURIL-ALFONSO, C.; DURANTHON, V. Y VICENTE, J. S. (2014). "Vitrification Alters Rabbit Foetal Placenta at Transcriptomic and Proteomic Level." *Reproduction Research*. 147: 789-801. DOI 10.1530/REP-14-0019
- SAENZ-DE-JUANO, M.D.; VICENTE, J.S.; HOLLUNG, K. Y MARCO-JIMÉNEZ, F. (2015). "Effect of Embryo Vitrification on Rabbit Foetal Placenta Proteome during Pregnancy." *Plos one*. 10: e0125157. DOI 10.1371/journal.pone.0125157
- SHARMA, A. (2014). "Bioinformatic Analysis Revealing Association of Exosomal mRNAs and Proteins in Epigenetic Inheritance." *Journal of Theoretical Biology*. 357: 143-149. DOI 10.1016/j.jtbi.2014.05.019
- SHEN, L.; LIU, Z.; GONG, J.; ZHANG, L.; WANG, L.; MAGDALOU, J.; CHEN, L. Y WANG, H. (2014). "Prenatal Ethanol Exposure Programs an Increased Susceptibility of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Female Adult Offspring Rats." *Toxicology and Applied*

- Pharmacology*. 274: 263-273. DOI 10.1016/j.taap.2013.11.009
- SHIOMI, M. Y ITO, T. (2009). "The Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) Rabbit, Its Characteristics and History of Development: A Tribute to the Late Dr. Yoshio Watanabe." *Atherosclerosis*. 207: 1-7. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.024
- SKINNER, M.K. (2008). "What Is an Epigenetic Transgenerational Phenotype?. F3 or F2." *Reproductive Toxicology*. 25: 2-6. DOI 10.1016/j.reprotox.2007.09.001
- SONG, Y.; SHARP, R.; LU, F. Y HASSAN, M. (2010). "The Future Potential of Cryopreservation for Assisted Reproduction." *Cryobiology*. 60: 60-65. DOI 10.1016/j.cryobiol.2009.09.009
- STAMPS, J. (2003). "Behavioural Processes Affecting Development: Tinbergen's Fourth Question Comes of Age." *Animal Behaviour*. 66: 1-13. DOI 10.1006/anbe.2003.2180
- STEEN, H. Y MANN, M. (2004). "The Abc's (and Xyz's) of Peptide Sequencing." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5: 699-711. DOI 10.1038/nrm1468
- STÜBINGER, S. Y DARD, M. (2013). "The Rabbit as Experimental Model for Research in Implant Dentistry and Related Tissue Regeneration." *Journal of Investigative Surgery*. 26: 266-282. DOI 10.3109/08941939.2013.778922
- SUPEK, F.; BOŠNJAK, M.; ŠKUNCA, N. Y ŠMUC, T. (2011). "Revigo Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms." *PLoS ONE*. 6: e21800. DOI 10.1371/journal.pone.0021800
- 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*. 15: 881-889.
- TROUNSON, A. Y MOHR, L. (1983). "Human Pregnancy Following Cryopreservation, Thawing and Transfer of an Eight-Cell Embryo." *Nature*. 305: 707-709.
- VAJTA, G. Y KUWAYAMA, M. (2006). "Improving Cryopreservation Systems." *Theriogenology*. 65: 236-244. DOI 10.1016/j.theriogenology.2005.09.026
- 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: 657-662.
- VICENTE, J. S.; SAENZ-DE-JUANO, M. D.; JIMÉNEZ-TRIGOS, E.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; PEÑARANDA, D. S. Y MARCO-JIMÉNEZ, F. (2013). "Rabbit Morula Vitrification Reduces Early Foetal Growth and Increases Losses throughout Gestation." *Cryobiology*. 67: 321-326. DOI 10.1016/j.cryobiol.2013.09.165
- VIEBAHN, C. (2001). "Hensen's Node." *Genesis*. 103: 96-103.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; CORTELL, C. Y VICENTE, J.S. (2010). "Dextran Vitrification Media Prevents Mucin Coat and Zona Pellucida Damage in Rabbit Embryo." *Theriogenology*. 74: 1623-1628. DOI 10.1016/j.theriogenology.2010.06.034
- WANG, Z.; XU, L. Y HE, F. (2010). "Embryo Vitrification Affects the Methylation of the H19/Igf2 Differentially Methylated Domain and the Expression of H19 and Igf2." *Fertility and Sterility*. 93: 2729-2733. DOI 10.1016/j.fertnstert.2010.03.025
- WANG, L.; SHEN, L.; PING, J.; ZHANG, L.; LIU, Z. Y WU, Y. (2014). "Intrauterine Metabolic Programming Alteration Increased Susceptibility to Non-Alcoholic Adult Fatty Liver Disease in Prenatal Caffeine-Exposed Rat Offspring." *Toxicology Letters*. 224: 311-318. DOI 10.1016/j.toxlet.2013.11.006

- WEI, Y.; SCHATTEN, H. Y SUN, Q.Y. (2015). "Environmental Epigenetic Inheritance through Gametes and Implications for Human Reproduction." *Human Reproduction Update*. 21: 194-208. DOI 10.1093/humupd/dmu061
- WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P. Y MAZUR, P. (1972). "Survival of Mouse Embryos Frozen to -196°C and -269°C." *Science*. 178: 411-414.
- WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E. Y MOOR, R.M. (1976). "Deep Freezing of Sheep Embryos." *Journal of reproduction and fertility*. 46: 151-154.
- WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y. Y CRITSER, J.K. (2004). "Fundamental Cryobiology of Reproductive Cells and Tissues." *Cryobiology*. 48: 146-156. DOI 10.1016/j.cryobiol.2004.03.002
- ZERNICKA-GOETZ, M.; MORRIS, S.A. Y BRUCE, A.W. (2009). "Making a Firm Decision: Multifaceted Regulation of Cell Fate in the Early Mouse Embryo." *Nature Reviews Genetics*. 10: 467-477. DOI 10.1038/nrg2564
- ZHAO, X.M.; DU, W.H.; HAO, H.S.; WANG, D.; QIN, T.; LIU, Y. Y ZHU, H.B. (2012). "Effect of Vitrification on Promoter Methylation and the Expression of Pluripotency and Differentiation Genes in Mouse Blastocysts." *Molecular Reproduction and Development*. 79: 445-450. DOI 10.1002/mrd.22052

ANEJOS

ANEJO I

ANEJO I

En este Anejo se incluyen los resultados del análisis de la reproducibilidad del ensayo proteómico seguido, “bottom-up” basado en un espectrómetro de masas en tándem acoplado a cromatografía líquida (LC-MS/MS). La **Tabla Al. 1** recoge el resumen de este ensayo, mientras que las figuras, en las que se enfrenta el número de péptidos o proteínas identificados (eje X) y los coeficientes de variación (CV) calculados, reflejan las distribuciones de estos CV calculados para las intensidades de los péptidos (**Figura Al. 1**), las de las proteínas (**Figura Al. 2**) y las intensidades LFQ de las proteínas (**Figura Al. 3**).

Tabla Al. 1. Tabla resumen del ensayo de reproducibilidad. Para la depuración en base a la intensidad de los péptidos, en base a la intensidad de las proteínas y en base a la intensidad “Label-free quantification” (LFQ) de las proteínas se recoge: el número de péptidos o proteínas identificadas por MaxQuant, el número de péptidos o proteínas que quedan tras depurar los archivos, el número de péptidos con un coeficiente de variación (CV) aceptable (< 20%) y el promedio y la mediana de los CV.

Intensidad (péptidos)	
Número de péptidos	10226
Número de péptidos después de filtrar	6394
Número de péptidos con CV<20% (% del total)	3884(61%)
Promedio CV	21,91%
Mediana CV	14,5%
Intensidad (proteínas)	
Número de proteínas	1484
Número de proteínas después de filtrar	1266
Número de proteínas con CV<20% (% del total)	724(57,2%)
Promedio CV	23,30%
Mediana CV	17,42%
Intensidad LFQ (proteínas)	
Número de proteínas	1484
Número de proteínas después de filtrar	1096
Número de proteínas con CV<20% (% del total)	875(79,84%)
Promedio CV	29,68%
Mediana CV	5,24%

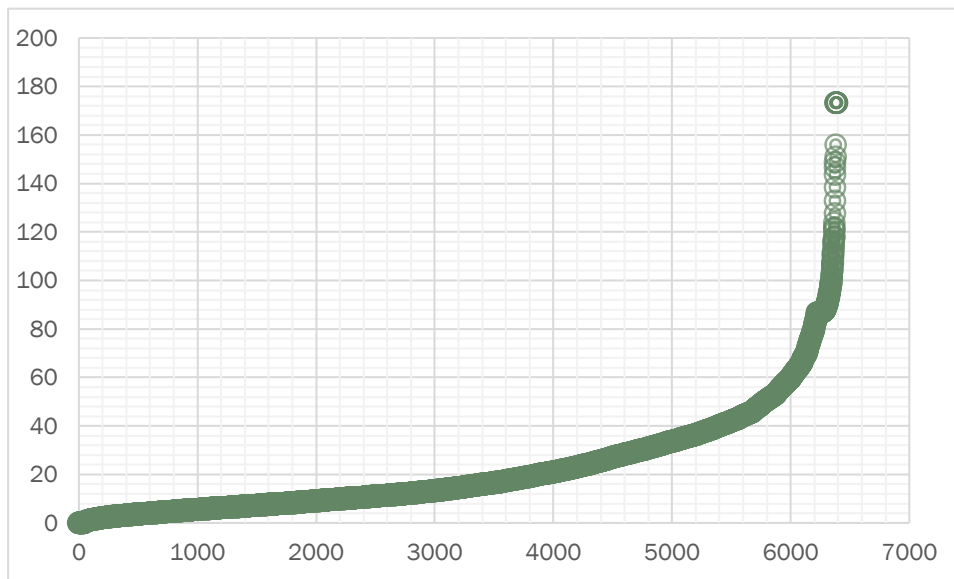


Figura AI. 1. Distribución de los coeficientes de variación (CV) de los péptidos identificados en base a la intensidad. En el eje X se representa el n° de péptidos, mientras que en el eje Y se representa el coeficiente de variación (CV) de la intensidad en las tres carreras.

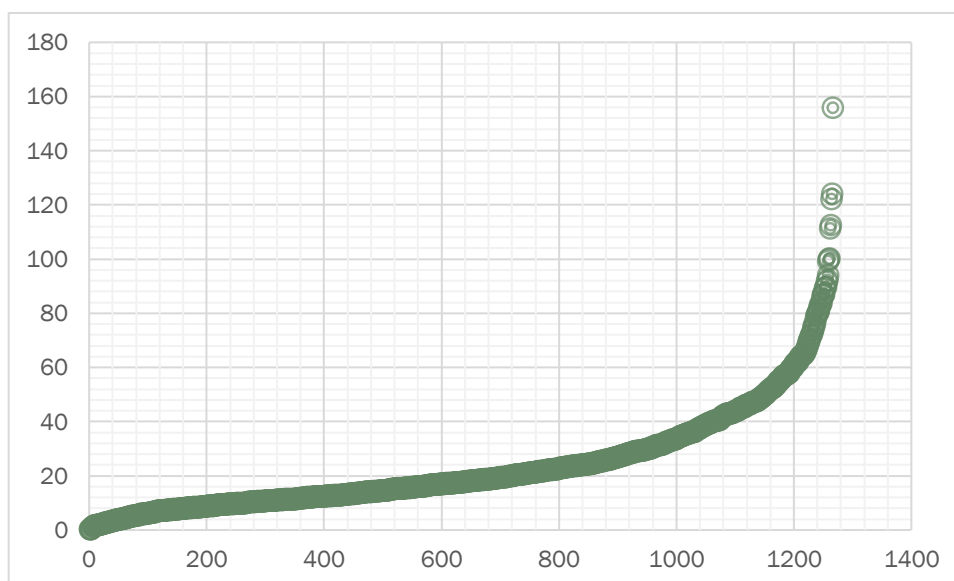


Figura AI. 2. Distribución de los coeficientes de variación (CV) de las proteínas identificados en base a la intensidad. En el eje X se representa el n° de proteínas, mientras que en el eje Y se representa el coeficiente de variación (CV) de la intensidad de las tres carreras.

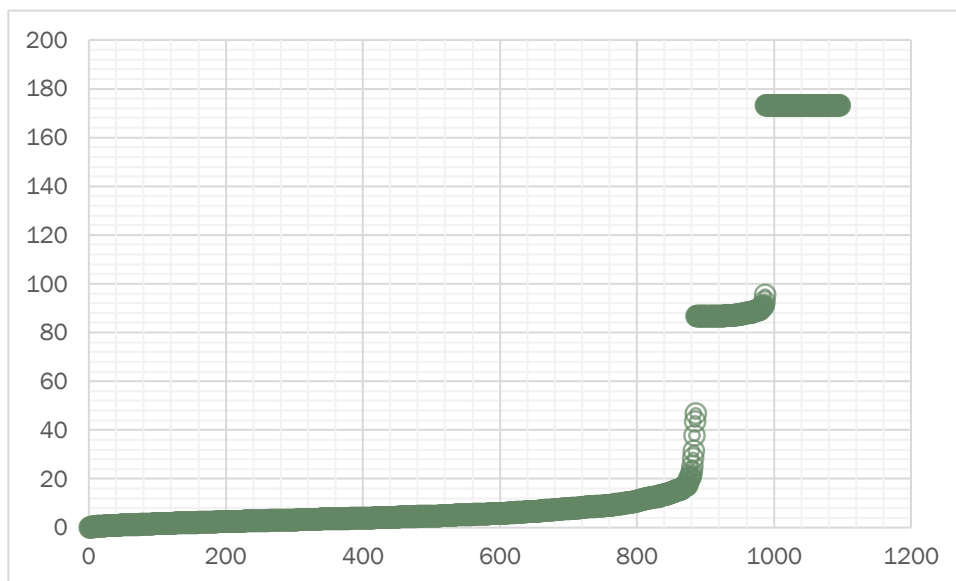


Figura Al. 3. Distribución de los coeficientes de variación (CV) de las proteínas identificadas en base a la intensidad “Label-free quantification” (LFQ). En el eje X se representa el n° de proteínas, mientras que en el eje Y se representa el coeficiente de variación (CV) de la intensidad de las tres carreras.

ANEJO II

ANEJO II

Este Anejo recoge los gráficos de dispersión generados con el Análisis de Componentes Principales (ACP) para las comparaciones **F1 vs F2** (Figura AII. 1), **F1 vs VF1** (Figura AII. 3) y **F2 vs VF2** (Figura AII. 5), así como los *HeatMap* obtenidos con el algoritmo de agrupamiento jerárquico basado en el método “Complete-linkage” para las mismas comparaciones (Figura AII. 2, AII. 4 y AII. 6, respectivamente).

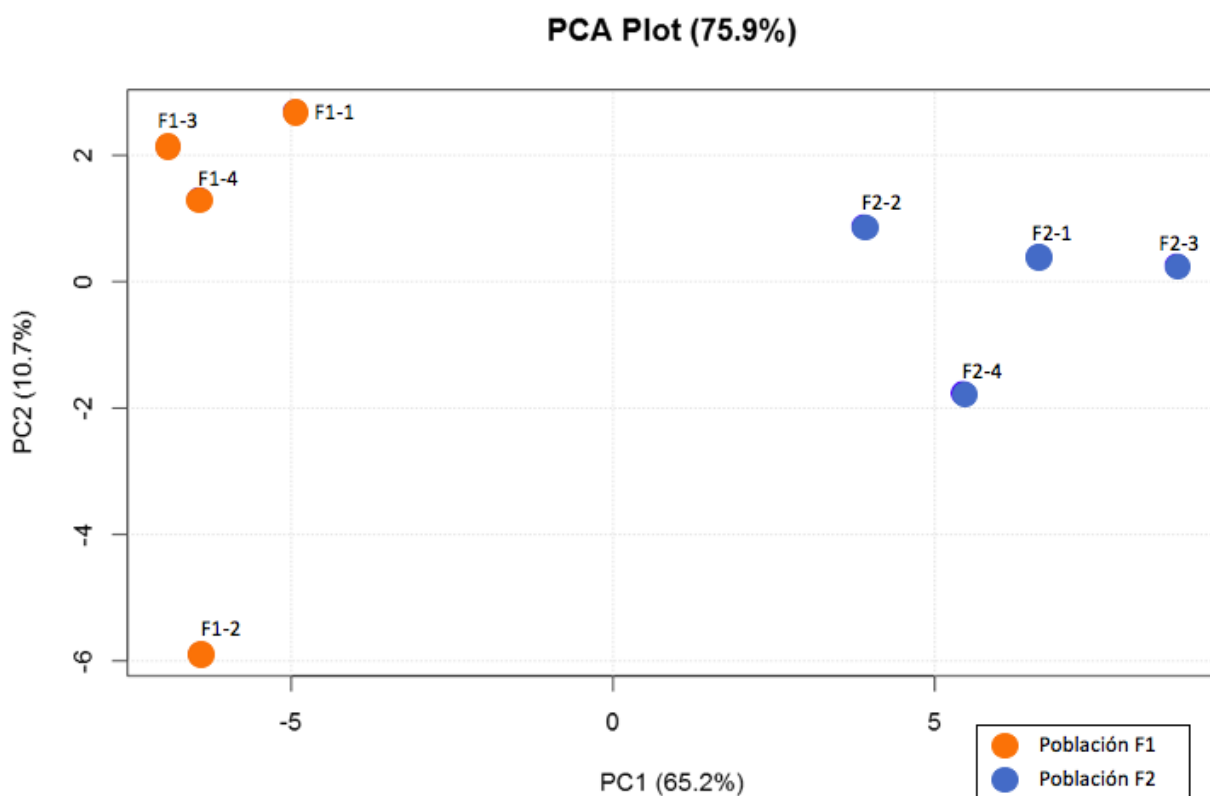


Figura AII. 1. Gráfico obtenido con el Análisis de la Componente Principal (ACP) de las proteínas diferencialmente expresadas en la comparación **F1 vs F2**. La componente principal 1 (PC1; 65,2% de la variabilidad), separa las muestras del grupo **F1** de las del grupo **F2**.

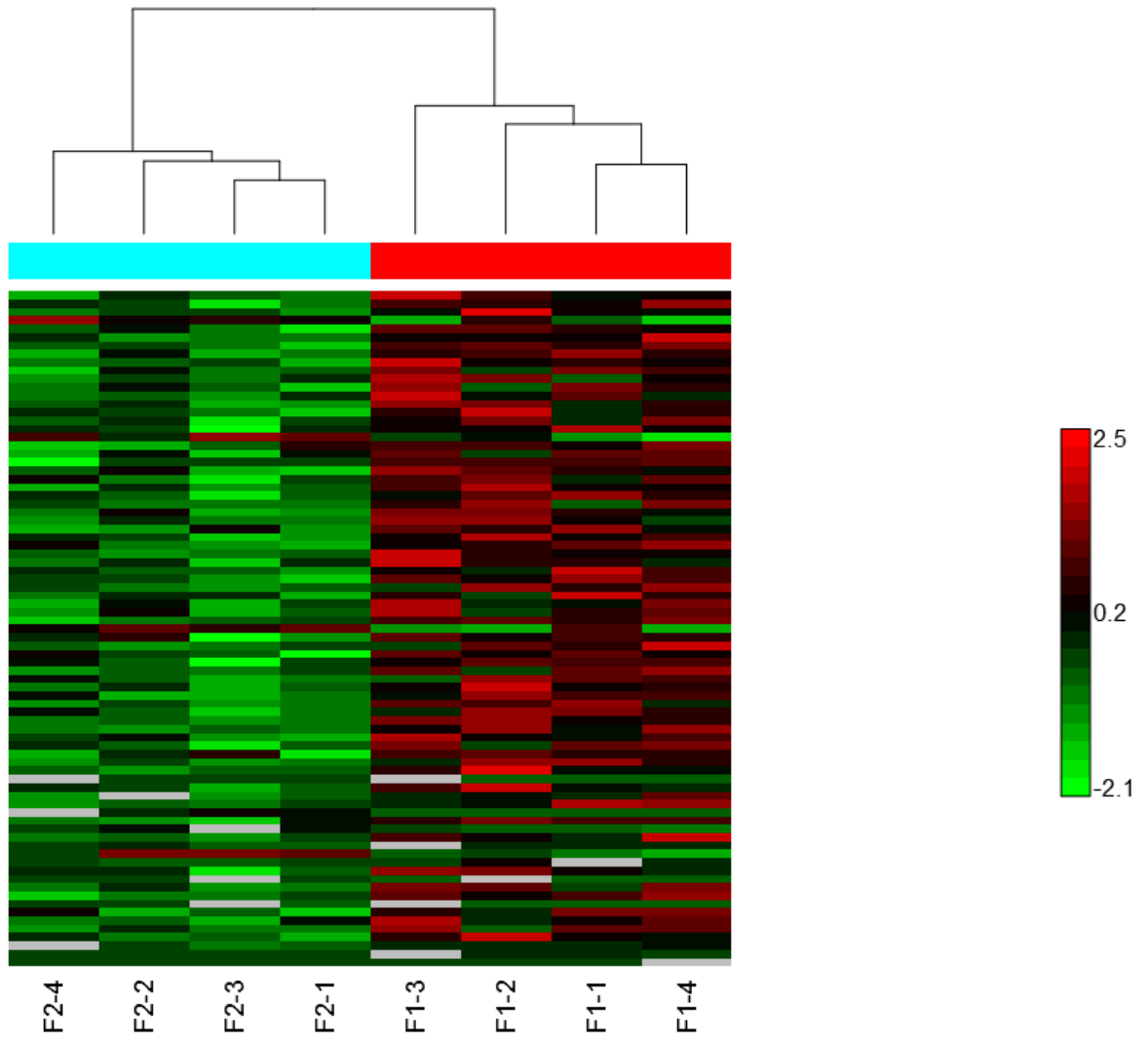


Figura AII. 2. *HeatMap* obtenido con el clustering de las muestras de la comparación **F1 vs F2** en base a las proteínas diferencialmente esperadas de la misma comparación.

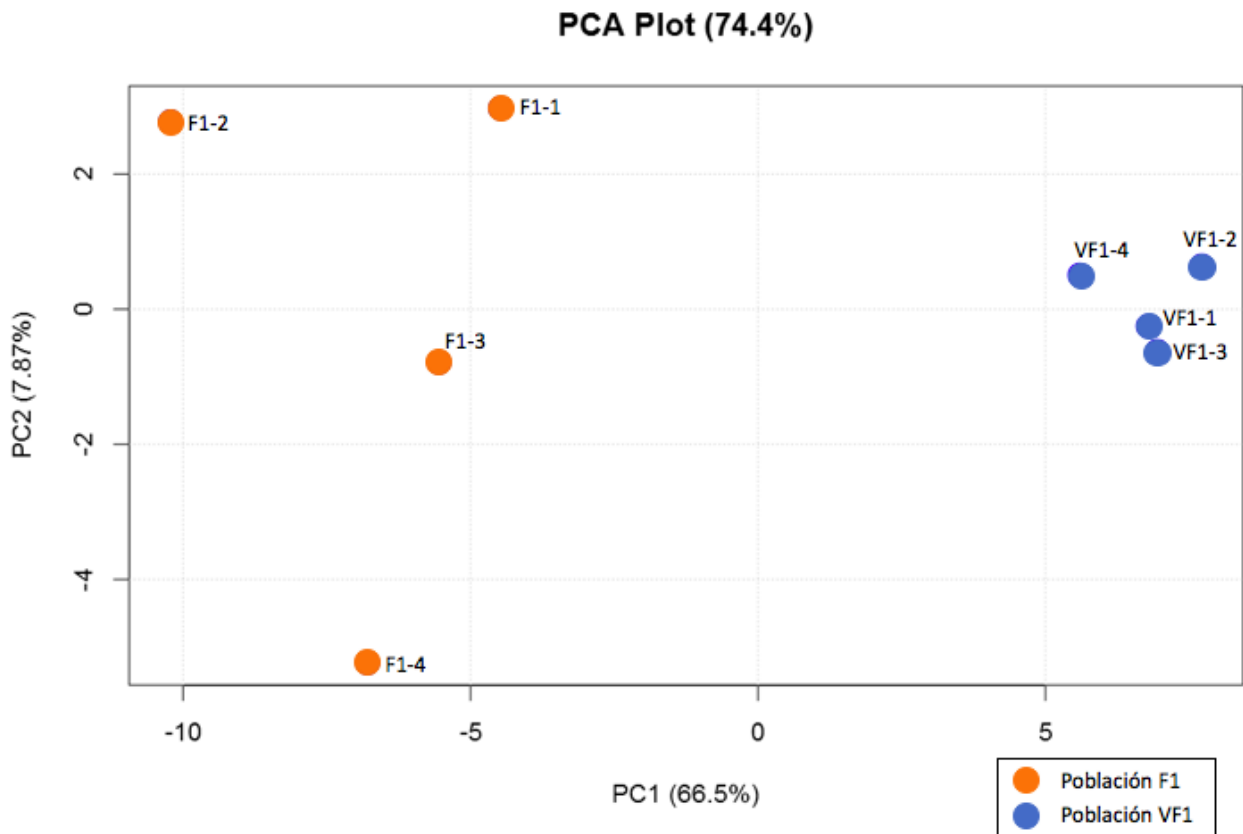


Figura AII. 3. Gráfico obtenido tras el Análisis de la Componente Principal (ACP) de las proteínas diferencialmente expresadas en la comparación **F1 vs VF1**. La componente principal 1 (PC1; 66,5% de la variabilidad), separa las muestras del grupo **F1** de las del grupo **VF1**.

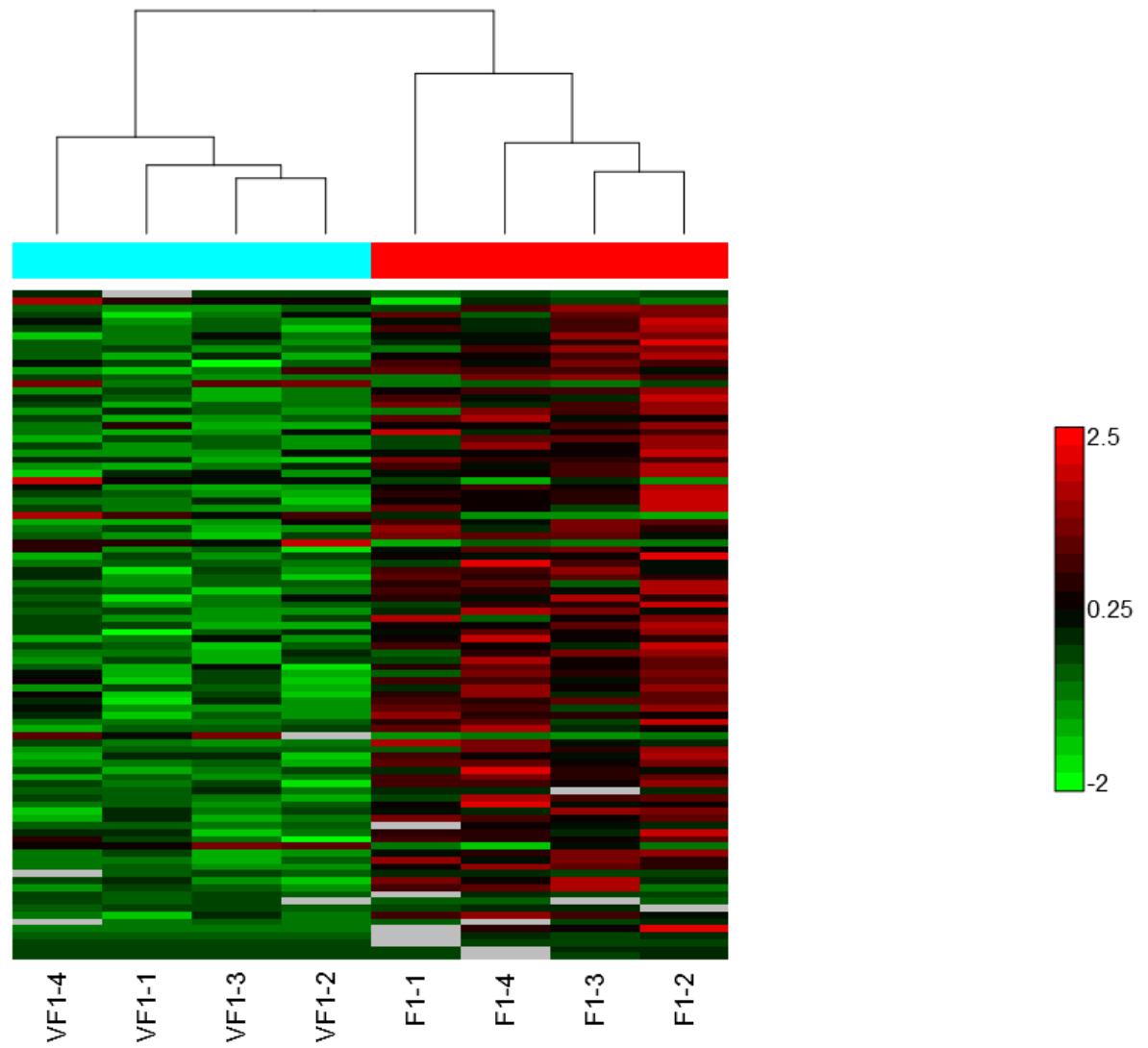


Figura AII. 4. Heatmap obtenido con el clustering de las muestras de la comparación **F1 vs VF1** en base a las proteínas diferencialmente expresadas en la misma comparación.

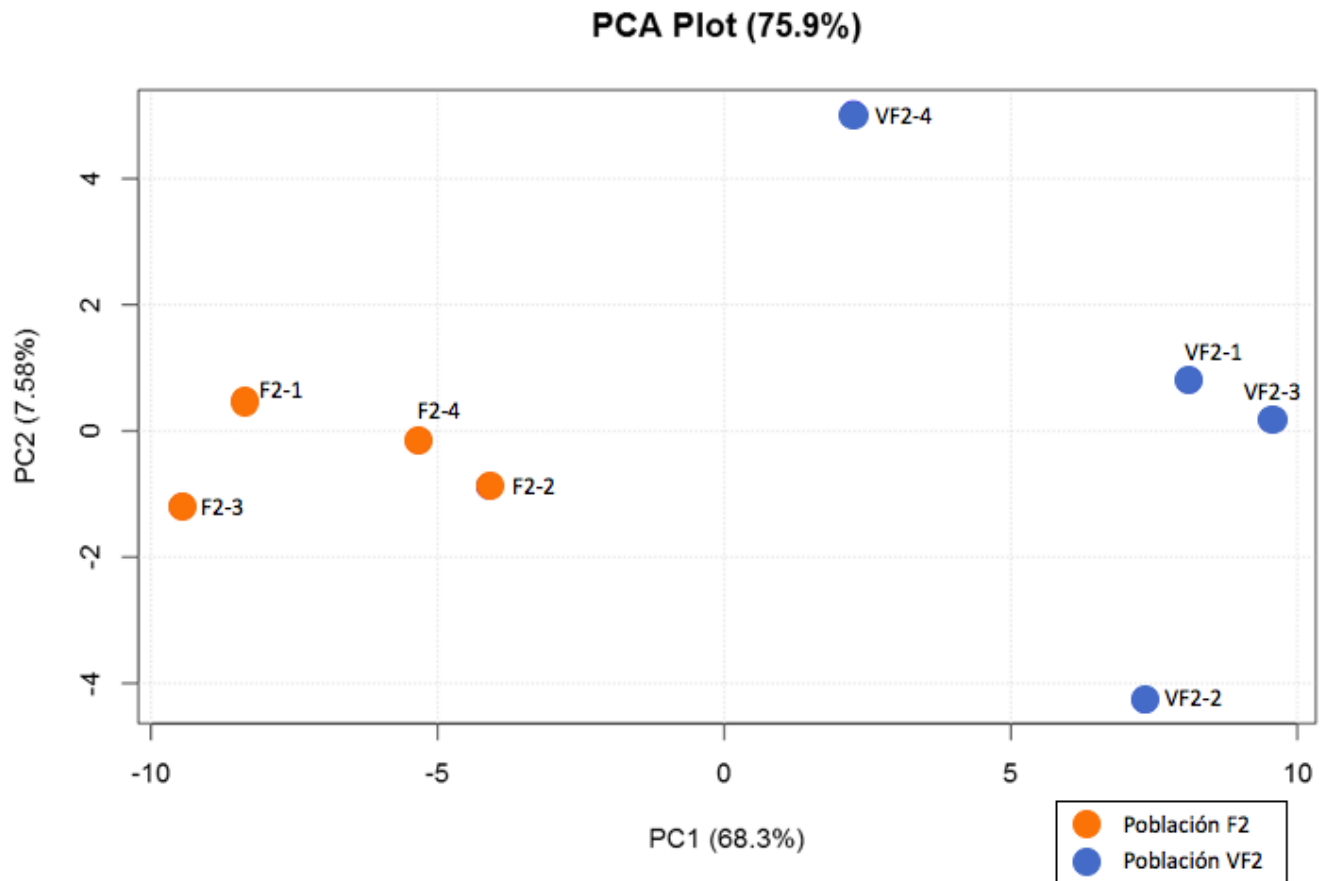


Figura AII. 5. Gráfico obtenido tras el Análisis de la Componente Principal (ACP) de las proteínas diferencialmente expresadas en la comparación **F2 vs VF2**. La componente principal 1 (PC1; 68,3% de la variabilidad), separa las muestras del grupo **F2** de las del grupo **VF2**.

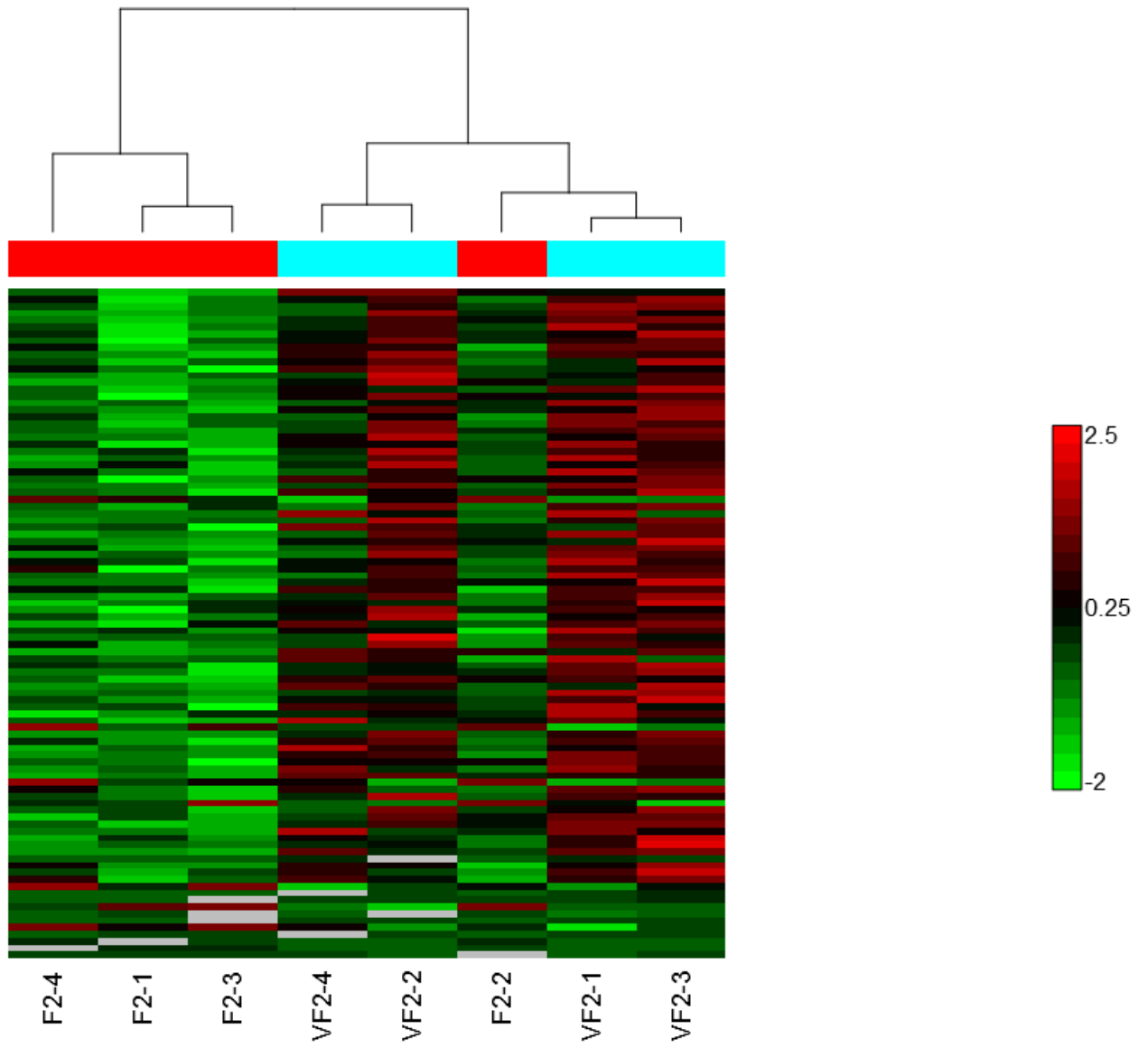


Figura AII. 6. *Heatmap* obtenido con el clustering de las muestras de la comparación **F2 vs VF2** en base a las proteínas diferencialmente expresadas en la misma comparación.

ANEJO III

ANEJO III

En este Anejo se incluyen tres tablas (**Tabla AIII. 1 a AIII. 3**), correspondientes a las tres comparaciones consideradas respectivamente (**F1 vs F2**, **F1 vs VF1** y **F2 vs VF2**). Estas recogen las proteínas diferencialmente expresadas (p-valor ANOVA inferior a 0,05) que permanecen tras aplicar los filtros descritos en el apartado 3.7.3. Para cada proteína que permanece se incluye su p-valor obtenido en ANOVA, el Fold-Change (FC) de las intensidades promedio y el estadístico T obtenido con el t-Test realizado.

Tabla AIII. 1. Proteínas diferencialmente expresadas y filtrada en base a los valores del Fold Change (FC) de las intensidades promedio y del t-test para la comparación **F1 vs F2** (efecto de la generación).

Proteína diferencialmente expresadas ^a	p-valor ^b	FC ^c	Estadístico-T ^d
182 kDa tankyrase-1-binding protein	0,015	-0,539	0,015
40S ribosomal protein S27-like	0,010	1,303	0,010
Actin, aortic smooth muscle	0,003	15,266	0,053
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM1, mitochondrial	0,039	-0,339	0,039
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM2B, mitochondrial	0,007	-0,502	0,007
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM5, mitochondrial	0,008	-0,642	0,008
Alcohol dehydrogenase 6	0,004	2,045	0,117
Annexin A13	0,028	0,993	0,028
Apolipoprotein C-I	0,010	-0,475	0,010
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	0,031	-0,469	0,031
Cathepsin Z	0,020	-0,398	0,020
Cellular nucleic acid-binding protein	0,028	-0,359	0,028
Cocaine esterase	0,049	0,630	0,049
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	0,013	-0,391	0,013
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	0,045	-0,363	0,045
Cytochrome c	0,012	-0,339	0,012
Cytochrome c oxidase copper chaperone	0,001	-0,888	0,050
Cytochrome P450 2C18	0,050	-0,362	0,050
Cytosolic 5'-nucleotidase 3A	0,017	1,101	0,228
Dipeptidyl peptidase 1	0,009	-0,436	0,009
Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	0,008	-0,612	0,008
Glutaredoxin-1	0,000	-0,841	0,000
Glutathione S-transferase Mu 1	0,025	-0,359	0,025
Golgin subfamily A member 2	0,004	-0,811	0,001
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	0,020	-0,424	0,020
Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	0,032	-0,403	0,032
Immunoglobulin heavy constant alpha 1	0,011	-0,546	0,011

Immunoglobulin J chain	0,042	-0,476	0,042
Ketimine reductase mu-crystallin	0,025	-0,339	0,025
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	0,022	-0,377	0,022
Mitochondrial ornithine transporter 1	0,025	-0,465	0,025
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	0,040	-0,377	0,040
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	0,026	-0,423	0,026
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	0,046	-0,420	0,046
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	0,017	-0,376	0,017
NADPH-cytochrome P450 reductase	0,029	-0,415	0,029
NIF3-like protein 1	0,038	1,661	0,038
Palmdelphin	0,045	-0,469	0,045
Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	0,012	-0,371	0,012
Protein canopy homolog 2	0,001	-0,434	0,001
Protein FAM136A	0,020	-0,654	0,020
Protein Hook homolog 3	0,001	-0,699	0,099
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	0,002	-0,429	0,002
RNA-binding protein 4B	0,022	-0,449	0,022
SAP domain-containing ribonucleoprotein	0,035	-0,451	0,035
SEC14-like protein 3	0,036	-0,758	0,013
Serine-threonine kinase receptor-associated protein	0,048	-0,446	0,048
Serine/arginine-rich splicing factor 10	0,007	-0,490	0,007
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3	0,002	-0,567	0,002
Sorting nexin-12	0,018	-0,468	0,018
Sorting nexin-5	0,021	-0,434	0,021
Thymidine phosphorylase	0,024	-0,426	0,024
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	0,037	-0,393	0,037
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	0,004	-0,336	0,004
UPF0160 protein MYG1, mitochondrial	0,043	1,389	0,203

^a Nombre de la proteína humana homóloga a la proteína de conejo identificada.

^b p-valor obtenido con el Análisis de la Varianza (ANOVA), con el que obtienen las proteínas diferencialmente expresadas (p-valor<0,05).

^{c-d} Filtros aplicados sobre las proteínas diferencialmente expresadas en base al Fold Change (FC) de las intensidades promedio^c y del estadístico T calculado^d.

Tabla AIII. 2. Proteínas diferencialmente expresadas y filtradas en base a los valores del Fold Change (FC) de las intensidades promedio y del t-Test para la comparación **F1 vs VF1** (efecto directo de la criopreservación).

Proteína diferencialmente expresadas ^a	p-valor ^b	FC ^c	Estadístico-T ^d
5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	0,018	-0,907	0,090
60S ribosomal protein L15	0,022	-0,464	0,022
60S ribosomal protein L23a	0,005	-0,369	0,005
60S ribosomal protein L5	0,002	-0,459	0,002

Afamin	0,047	-0,523	0,047
Apolipoprotein A-IV	0,012	-0,434	0,012
Bile salt export pump	0,009	-0,437	0,009
Calpastatin	0,005	-0,430	0,005
Carbonyl reductase [NADPH] 1	0,014	-0,997	0,070
Cold shock domain-containing protein E1	0,002	-0,514	0,002
Crk-like protein	0,018	-0,342	0,018
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	0,024	-0,330	0,024
Cytochrome c	0,036	-0,306	0,036
Cytochrome P450 1A1	0,047	-0,595	0,047
Cytochrome P450 2B6	0,049	-0,505	0,049
Cytochrome P450 2B6	0,023	-0,655	0,023
Cytochrome P450 2C18	0,016	-0,500	0,016
Cytochrome P450 2E1	0,023	-0,617	0,023
Cytochrome P450 3A4	0,049	-0,774	0,049
Cytoskeleton-associated protein 4	0,000	-0,695	0,000
D-dopachrome decarboxylase	0,005	0,530	0,005
Erlin-1	0,000	-0,924	0,037
Ethanolamine-phosphate phospho-lyase	0,013	-0,432	0,013
Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A	0,028	-0,547	0,028
Glutathione S-transferase P	0,039	-0,322	0,039
Golgin subfamily A member 2	0,001	-0,414	0,001
GTP-binding protein SAR1b	0,008	-0,336	0,008
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	0,000	-0,899	0,041
Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase MESH1	0,002	2,910	0,089
Immunoglobulin heavy constant alpha 1	0,007	-0,394	0,007
Indolethylamine N-methyltransferase	0,007	-0,301	0,007
Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	0,029	-0,575	0,029
Lamin-B1	0,017	-0,365	0,017
Leucine zipper protein 1	0,006	1,240	0,006
Methyltransferase-like protein 7A	0,033	-0,414	0,033
Mitochondrial fission factor	0,001	-0,935	0,043
Myosin-11	0,039	0,527	0,039
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	0,009	0,846	0,009
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3	0,004	-0,616	0,004
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	0,014	-0,518	0,014
Palmdelphin	0,037	-0,414	0,037
Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	0,002	3,538	0,081
Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	0,011	-0,333	0,011
Phospholipase D3	0,039	-0,729	0,128
Protein FAM136A	0,044	-0,515	0,044

Quinone oxidoreductase PIG3	0,007	-0,367	0,007
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	0,003	-0,542	0,003
S-phase kinase-associated protein 1	0,036	-0,408	0,036
Serine-pyruvate aminotransferase	0,007	-0,389	0,007
Serine/arginine-rich splicing factor 10	0,048	-0,443	0,048
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3	0,007	-0,459	0,007
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	0,047	-0,305	0,047
Thymidine phosphorylase	0,023	-0,313	0,023
Transgelin-2	0,031	-0,331	0,031
UDP-glucuronosyltransferase 1-3	0,031	-0,486	0,031
UDP-glucuronosyltransferase 2B4	0,020	-0,499	0,020
UPF0160 protein MYG1, mitochondrial	0,001	1,224	0,188
UV excision repair protein RAD23 homolog B	0,024	-0,368	0,024
Vacuolar protein sorting-associated protein 29	0,001	-0,436	0,001

^a Nombre de la proteína humana homóloga a la proteína de conejo identificada.

^b p-valor obtenido con el Análisis de la Varianza (ANOVA), con el que obtienen las proteínas diferencialmente expresadas (p-valor<0,05).

^{c-d} Filtros aplicados sobre las proteínas diferencialmente expresadas en base al Fold Change (FC) de las intensidades promedio^c y del estadístico T calculado^d.

Tabla AIII. 3. Proteínas diferencialmente expresadas y filtrada en base a los valores del Fold Change (FC) de las intensidades promedio y del t-Test para la comparación **F2 vs VF2** (efecto transgeneracional de la criopreservación).

Proteínas diferencialmente expresadas ^a	p-valor ^b	FC ^c	Estadístico-T ^d
182 kDa tankyrase-1-binding protein	0,004	1,071	0,004
2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	0,008	0,586	0,008
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	0,036	0,548	0,036
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	0,004	0,730	0,004
28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	0,034	0,934	0,034
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	0,016	0,439	0,016
40S ribosomal protein S13	0,048	1,016	0,048
40S ribosomal protein S27-like	0,008	-0,624	0,008
60S ribosomal protein L27	0,045	1,169	0,045
60S ribosomal protein L32	0,036	1,171	0,036
60S ribosomal protein L32	0,046	1,093	0,046
Actin-binding LIM protein 1	0,019	1,521	0,019
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM5, mitochondrial	0,001	0,940	0,001
Alanine-glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial	0,001	0,561	0,001
Alpha-soluble NSF attachment protein	0,018	0,444	0,018
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	0,007	0,563	0,007
ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	0,017	0,474	0,017
Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase	0,004	0,519	0,004
Calcyclin-binding protein	0,017	0,439	0,017

Cellular nucleic acid-binding protein	0,035	0,942	0,035
Cocaine esterase	0,037	2,187	0,037
Collagen alpha-2(I) chain	0,007	1,571	0,009
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	0,022	0,496	0,022
Cytochrome c oxidase copper chaperone	0,000	13,798	0,035
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	0,042	0,448	0,042
Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4	0,003	0,496	0,003
Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	0,037	0,645	0,037
Gap junction beta-3 protein	0,024	1,033	0,024
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	0,043	0,534	0,043
Glutaredoxin-1	0,007	3,150	0,007
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	0,044	-0,477	0,044
Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	0,026	0,550	0,026
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	0,034	3,728	0,034
Iron-sulfur cluster assembly 1 homolog, mitochondrial	0,019	6,520	0,101
Isoform 15 of Fibronectin	0,007	0,989	0,007
Junction plakoglobin	0,032	0,462	0,032
Ketimine reductase mu-crystallin	0,037	0,508	0,037
LIM domain only protein 7	0,031	1,321	0,031
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	0,004	0,666	0,004
N-acetylserotonin O-methyltransferase-like protein	0,027	1,473	0,027
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	0,030	-0,533	0,229
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	0,027	0,922	0,027
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	0,045	1,089	0,045
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	0,047	0,642	0,047
Nucleosome assembly protein 1-like 1	0,004	1,107	0,197
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	0,013	0,675	0,013
Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	0,037	0,479	0,037
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	0,040	0,494	0,040
Plasminogen	0,041	-0,426	0,041
Poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3	0,041	1,408	0,024
Porphobilinogen deaminase	0,037	0,511	0,037
Prefoldin subunit 6	0,003	1,079	0,003
Programmed cell death protein 4	0,010	-0,881	0,080
Prolargin	0,040	-0,485	0,040
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (0,035	0,511	0,035
Protein canopy homolog 3	0,017	1,320	0,017
Putative hydroxypyruvate isomerase	0,002	0,502	0,002
Ras-related protein Rab-5C	0,000	0,819	0,000
SAP domain-containing ribonucleoprotein	0,049	0,680	0,049
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	0,037	0,555	0,037

Serine-threonine kinase receptor-associated protein	0,012	1,039	0,012
Thyroid peroxidase	0,047	-0,485	0,047
Trafficking protein particle complex subunit 9	0,038	4,915	0,038
Transcriptional activator protein Pur-beta	0,001	-0,774	0,073
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	0,014	0,981	0,014
Ubiquilin-1	0,050	0,719	0,050
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	0,003	0,631	0,003
UDP-glucuronosyltransferase 1-6	0,001	-0,902	0,047

^a Nombre de la proteína humana homóloga a la proteína de conejo identificada.

^b p-valor obtenido con el Análisis de la Varianza (ANOVA), con el que obtienen las proteínas diferencialmente expresadas (p-valor<0,05).

^{c-d} Filtros aplicados sobre las proteínas diferencialmente expresadas en base al Fold Change (FC) de las intensidades promedio^c y del estadístico T calculado^d.

ANEJO IV

ANEJO IV

En este Anejo se recogen los gráficos circulares proporcionados por Panther sobre las categorías GO evaluadas (“Procesos biológico” y “Función Molecular”) para cada comparación considerada: F1 vs F2 (Figura AIV. 1 y AIV. 2), F1 vs VF1 (Figura AIV. 3 y AIV. 4) y F2 vs VF2 (Figura AIV.5 y AIV.6).

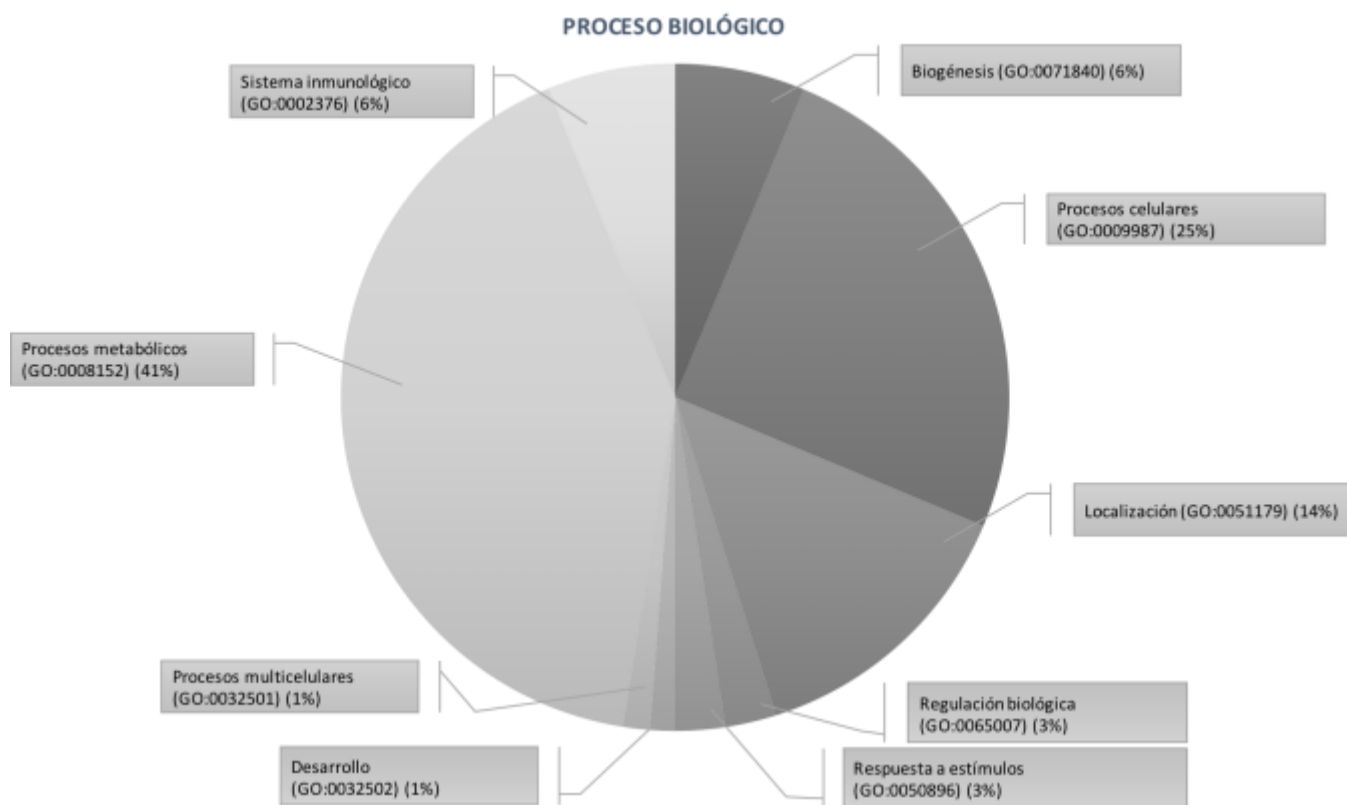


Figura AIV. 1. Gráfico circular obtenido mediante Panther sobre los procesos moleculares afectados por el efecto de la generación (F1 vs F2).

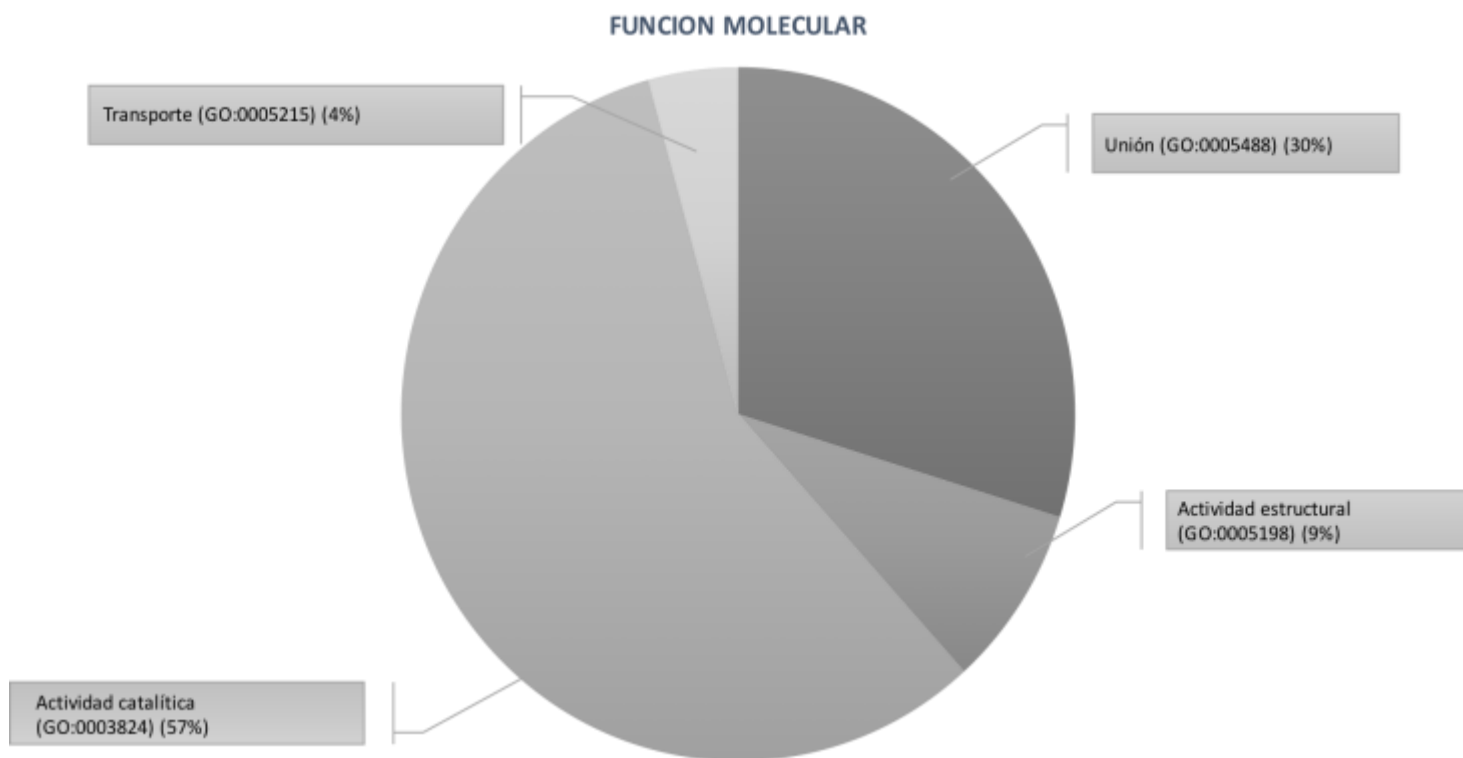


Figura AIV. 2. Gráfico circular obtenido mediante Panther sobre las funciones moleculares afectadas por el efecto de la generación (**F1 vs F2**).

PROCESOS BIOLÓGICOS

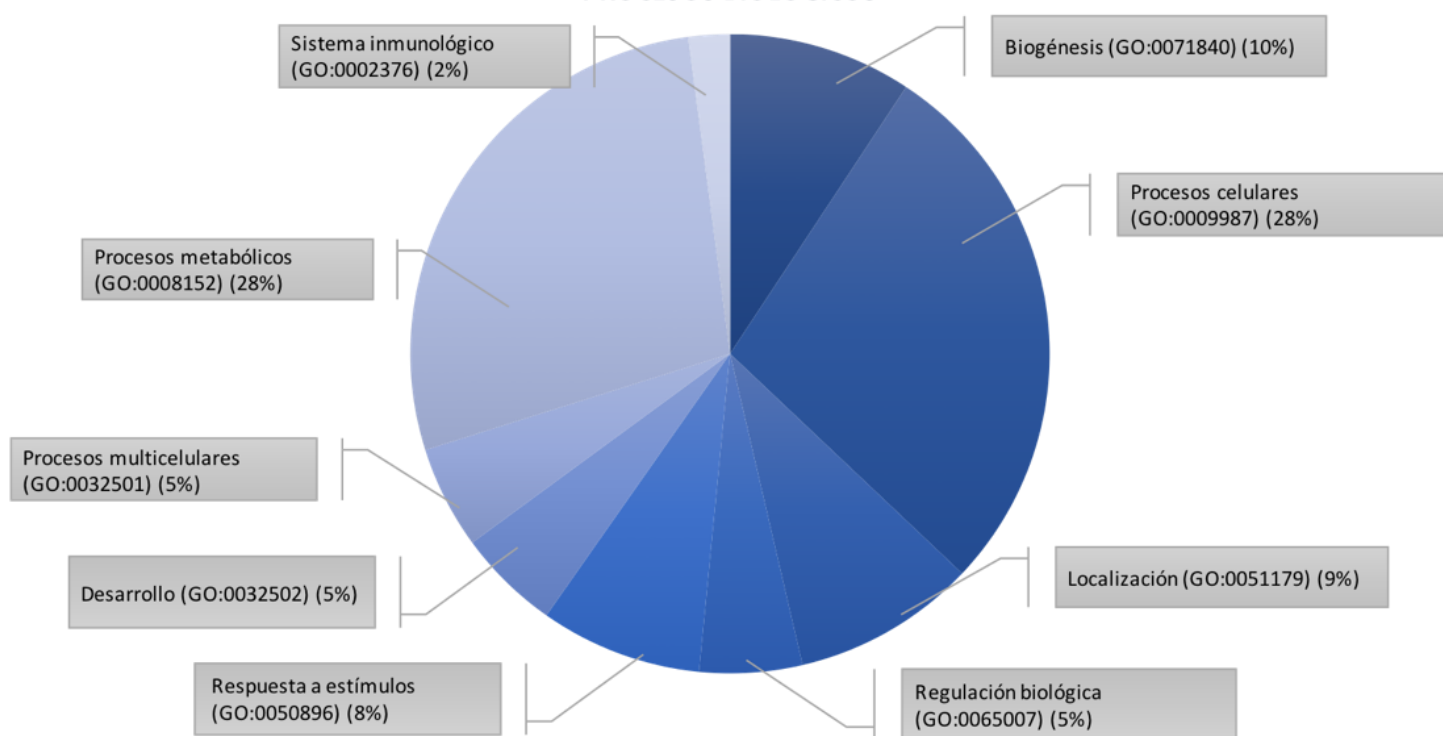


Figura AIV. 3. Gráfico circular obtenido mediante Panther sobre los procesos biológicos afectados por el efecto directo de la criopreservación (F1 vs VF1).

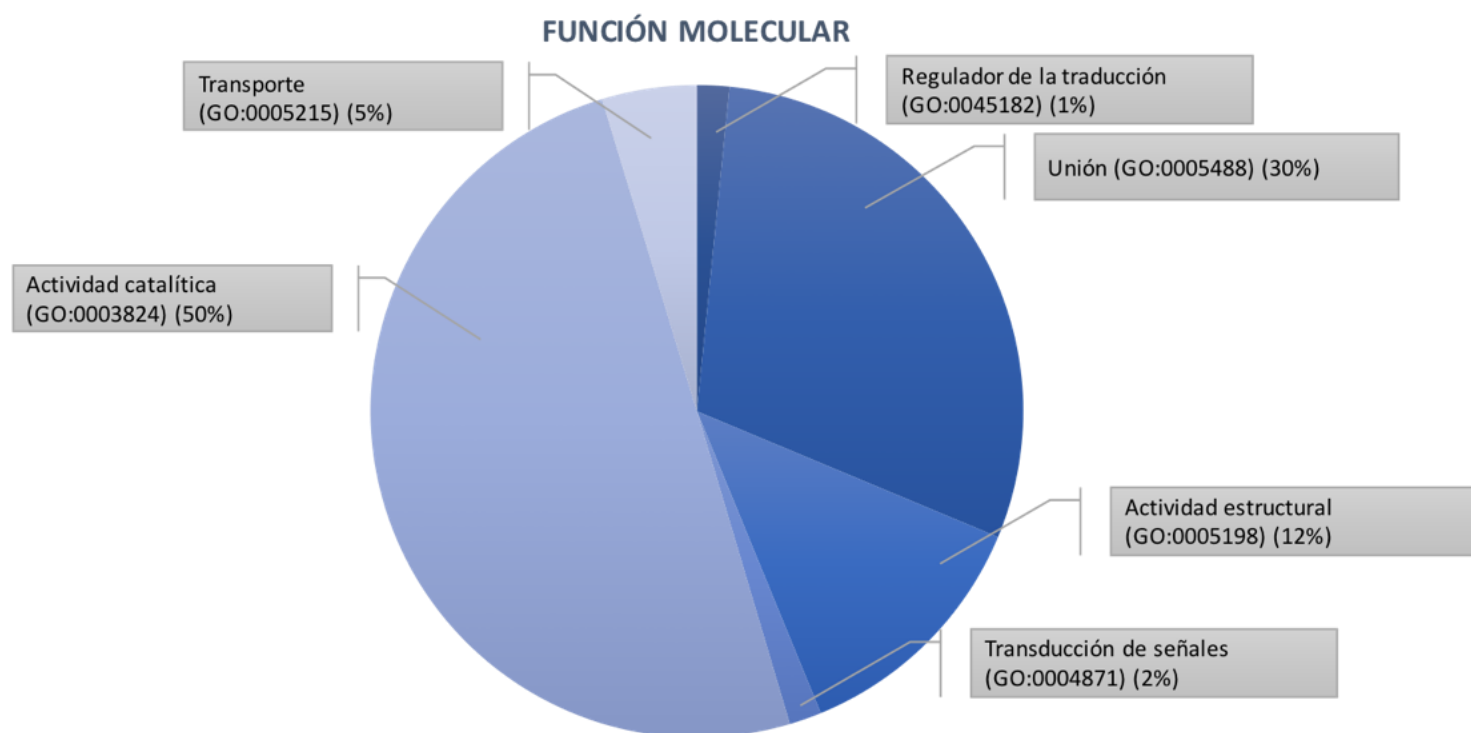


Figura AIV. 4. Gráfico circular obtenido mediante Panther sobre las funciones moleculares afectadas por el efecto directo de la criopreservación (**F1 vs VF1**).

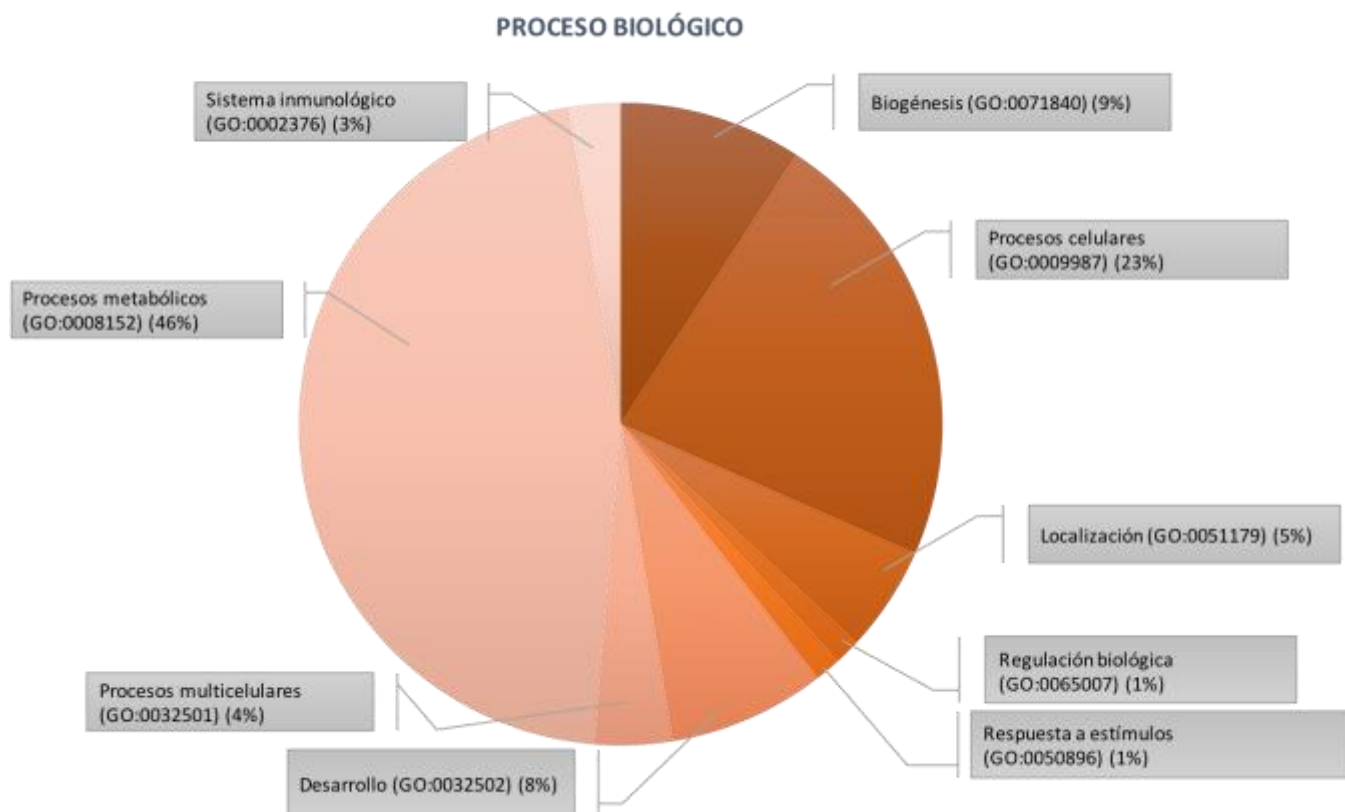


Figura AIV. 5. Gráfico circular obtenido mediante Panther sobre los procesos biológicos afectados por el efecto transgeneracional de la criopreservación (**F2 vs VF2**).

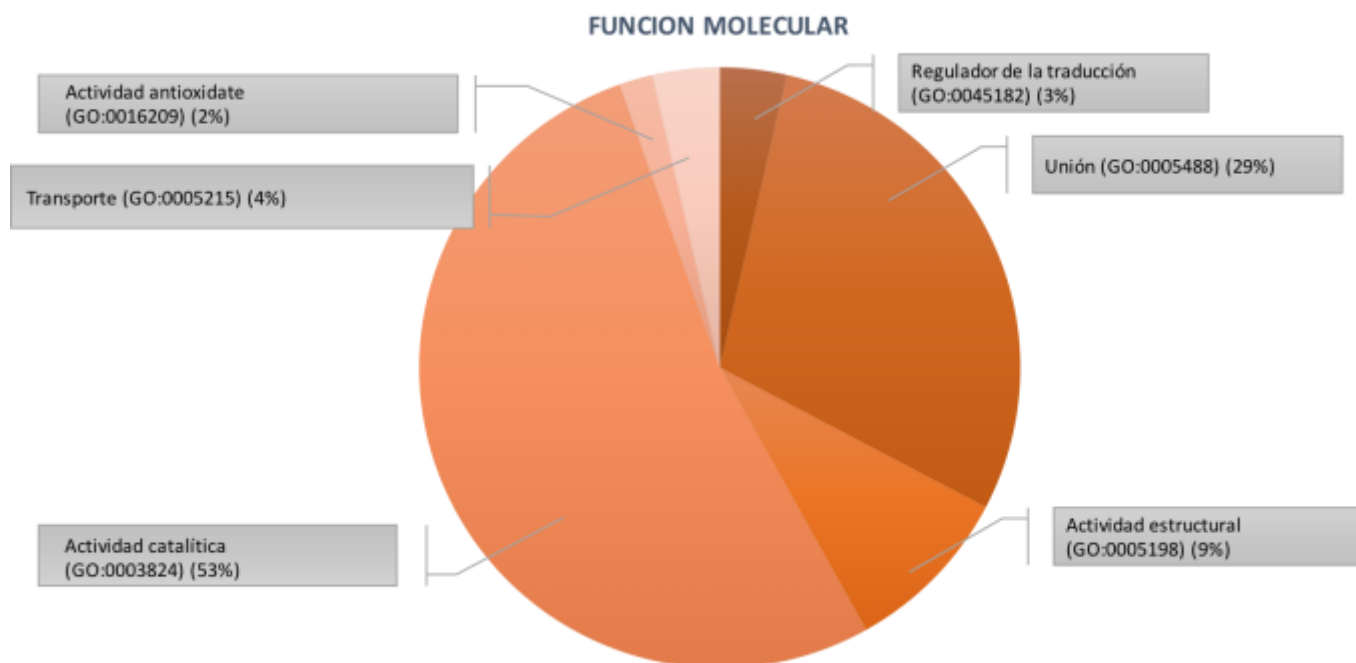


Figura AIV. 6. Gráfico circular obtenido mediante Panther sobre las funciones moleculares afectadas por el efecto transgeneracional de la criopreservación (F2 vs VF2).

ANEJO V

ANEJO V

Este Anejo recoge las tablas que incluyen los términos GO significativamente enriquecidos (p-valor inferior a 0,05) proporcionados por DAVID para las categorías GO evaluadas (“Procesos biológico” y “Función Molecular”) y para cada comparación considerada: **F1 vs F2 (Tabla AV. 1 y AV. 2)**, **F1 vs VF1 (Tabla AV. 3 y AV.4)** y **F2 vs VF2 (Tabla AV. 5 y AV. 6)**. Para cada término GO se incluye su descripción, el número de proteínas con este término GO asociado, el % que representa del total de proteínas del listado y el p-valor obtenido con el enriquecimiento.

Tabla AV. 1. Tabla resumen del resultado obtenido mediante DAVID. En ella aparecen los términos GO de la categoría "Proceso Biológico" enriquecidos en el listado de proteínas diferencialmente expresadas de la comparación **F1 vs F2** (efecto de la generación), junto con su descripción, el número de proteínas del mismo que tienen el término en cuestión asociado, el porcentaje que representan del total del listado y el p-valor obtenido en el análisis del enriquecimiento.

Término GO	Descripción	Nº de proteínas ^a	% de proteínas ^b	p-valor
GO:0003094	glomerular filtration	2	3,6	0,028
GO:0006119	oxidative phosphorylation	2	3,6	0,040
GO:0006120	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	5	9,1	0,000
GO:0006122	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	3	5,5	0,001
GO:0006213	pyrimidine nucleoside metabolic process	2	3,6	0,009
GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	4	7,3	0,001
GO:0006637	acyl-CoA metabolic process	3	5,5	0,002
GO:0006805	xenobiotic metabolic process	5	9,1	0,000
GO:0008152	metabolic process	6	10,9	0,000
GO:0019395	fatty acid oxidation	2	3,6	0,043
GO:0032981	mitochondrial respiratory chain complex I assembly	4	7,3	0,001
GO:0046135	pyrimidine nucleoside catabolic process	2	3,6	0,034
GO:0048208	COPII vesicle coating	3	5,5	0,016
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	3	5,5	0,010
GO:0055114	oxidation-reduction process	9	16,4	0,001
GO:0060267	positive regulation of respiratory burst	2	3,6	0,019

^a Número de proteínas del listado introducido en DAVID que tienen este término asociado.

^b Número de proteínas/ número total de proteínas del listado introducido (en porcentaje).

Tabla AV. 2. Tabla resumen del resultado obtenido mediante DAVID. En ella aparecen los términos GO de la categoría "Función Molecular" enriquecidos en el listado de proteínas diferencialmente expresadas de la comparación **F1 vs F2** (efecto de la generación), junto con su descripción, el número de proteínas del mismo que tienen el término en cuestión asociado, el porcentaje que representan del total del listado y el p-valor obtenido en el análisis del enriquecimiento.

Término GO	Descripción	Nº de proteínas ^a	% de proteínas ^b	p-valor
GO:0000166	nucleotide binding	5	9,1	0,021
GO:0003824	catalytic activity	4	7,3	0,019
GO:0003996	acyl-CoA ligase activity	3	5,5	0,000
GO:0004321	fatty-acyl-CoA synthase activity	3	5,5	0,000
GO:0008121	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	2	3,6	0,030
GO:0008137	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	4	7,3	0,000
GO:0009055	electron carrier activity	5	9,1	0,000
GO:0015645	fatty acid ligase activity	3	5,5	0,000
GO:0016405	CoA-ligase activity	2	3,6	0,006
GO:0016787	hydrolase activity	4	7,3	0,020
GO:0047760	butyrate-CoA ligase activity	3	5,5	0,000

^a Número de proteínas del listado introducido en DAVID que tienen este término asociado.

^b Número de proteínas/ número total de proteínas del listado introducido (en porcentaje).

Tabla AV. 3. Tabla resumen del resultado obtenido mediante DAVID. En ella aparecen los términos GO de la categoría "Proceso Biológico" enriquecidos en el listado de proteínas diferencialmente expresadas de la comparación **F1 vs VF1** (efecto directo de la criopreservación), junto con su descripción, el número de proteínas del mismo que tienen el término en cuestión asociado, el porcentaje que representan del total del listado y el p-valor obtenido en el análisis del enriquecimiento.

Término GO	Descripción	Nº de proteínas ^a	% de proteínas ^b	p-valor
GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	4	6,9	0,007
GO:0002933	lipid hydroxylation	2	3,4	0,019
GO:0006122	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	2	3,4	0,048
GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	3	5,2	0,038
GO:0006805	xenobiotic metabolic process	6	10,3	0,000
GO:0008202	steroid metabolic process	4	6,9	0,000
GO:0009308	amine metabolic process	2	3,4	0,026
GO:0016098	monoterpenoid metabolic process	2	3,4	0,019
GO:0017144	drug metabolic process	5	8,6	0,000
GO:0019373	epoxygenase P450 pathway	4	6,9	0,000
GO:0042359	vitamin D metabolic process	2	3,4	0,032
GO:0042738	exogenous drug catabolic process	2	3,4	0,039
GO:0045471	response to ethanol	3	5,2	0,046
GO:0046483	heterocycle metabolic process	2	3,4	0,019
GO:0055114	oxidation-reduction process	12	20,7	0,000

GO:0098609	cell-cell adhesion	8	13,8	0,000
-------------------	--------------------	---	------	-------

^a Número de proteínas del listado introducido en DAVID que tienen este término asociado.

^b Número de proteínas/ número total de proteínas del listado introducido (en porcentaje).

Tabla AV. 4. Tabla resumen del resultado obtenido mediante DAVID. En ella aparecen los términos GO de la categoría "Función Molecular" enriquecidos en el listado de proteínas diferencialmente expresadas de la comparación **F1 vs VF1** (efecto directo de la criopreservación), junto con su descripción, el número de proteínas del mismo que tienen el término en cuestión asociado, el porcentaje que representan del total del listado y el p-valor obtenido en el análisis del enriquecimiento.

Término GO	Descripción	Nº de proteínas^a	% de proteínas^b	p-valor
GO:0003924	GTPase activity	4	6,9	0,037
GO:0004497	monooxygenase activity	5	8,6	0,000
GO:0005506	iron ion binding	5	8,6	0,001
GO:0008392	arachidonic acid epoxygenase activity	3	5,2	0,001
GO:0008395	steroid hydroxylase activity	5	8,6	0,000
GO:0008483	transaminase activity	2	3,4	0,040
GO:0008670	2,4-dienoyl-CoA reductase (NADPH) activity	2	3,4	0,009
GO:0016491	oxidoreductase activity	4	6,9	0,025
GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	4	6,9	0,001
GO:0016712	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen	4	6,9	0,000
GO:0019166	trans-2-enoyl-CoA reductase (NADPH) activity	2	3,4	0,009
GO:0019825	oxygen binding	5	8,6	0,000
GO:0020037	heme binding	6	10,3	0,000
GO:0032403	protein complex binding	4	6,9	0,027
GO:0044822	poly(A) RNA binding	10	17,2	0,008
GO:0070330	aromatase activity	4	6,9	0,000
GO:0070576	vitamin D 24-hydroxylase activity	2	3,4	0,006
GO:0098641	cadherin binding involved in cell-cell adhesion	8	13,8	0,000

^a Número de proteínas del listado introducido en DAVID que tienen este término asociado.

^b Número de proteínas/ número total de proteínas del listado introducido (en porcentaje).

Tabla AV. 5. Tabla resumen del resultado obtenido mediante DAVID. En ella aparecen los términos GO de la categoría "Proceso Biológico" enriquecidos en el listado de proteínas diferencialmente expresadas de la comparación **F2 vs VF2** (efecto transgeneracional de la criopreservación), junto con su descripción, el número de proteínas del mismo que tienen el término en cuestión asociado, el porcentaje que representan del total del listado y el p-valor obtenido en el análisis del enriquecimiento.

Término GO	Descripción	Nº de proteínas^a	% de proteínas^b	p-valor
GO:0006120	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	3	4,5	0,015
GO:0006364	rRNA processing	4	6,1	0,048
GO:0006413	translational initiation	4	6,1	0,015
GO:0006544	glycine metabolic process	2	3	0,034
GO:0006554	lysine catabolic process	2	3	0,045
GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	3	4,5	0,017
GO:0006695	cholesterol biosynthetic process	3	4,5	0,009
GO:0007191	adenylate cyclase-activating dopamine receptor signaling pathway	2	3	0,045
GO:0008152	metabolic process	5	7,6	0,004
GO:0046487	glyoxylate metabolic process	3	4,5	0,004
GO:0055114	oxidation-reduction process	9	13,6	0,002
GO:1902600	hydrogen ion transmembrane transport	3	4,5	0,023

^a Número de proteínas del listado introducido en DAVID que tienen este término asociado.

^b Número de proteínas/ número total de proteínas del listado introducido (en porcentaje).

Tabla AV. 6. Tabla resumen del resultado obtenido mediante DAVID. En ella aparecen los términos GO de la categoría "Función Molecular" enriquecidos en el listado de proteínas diferencialmente expresadas de la comparación **F2 vs VF2** (efecto transgeneracional de la criopreservación), junto con su descripción, el número de proteínas del mismo que tienen el término en cuestión asociado, el porcentaje que representan del total del listado y el p-valor obtenido en el análisis del enriquecimiento.

Término GO	Descripción	Nº de proteínas^a	% de proteínas^b	p-valor
GO:0003697	single-stranded DNA binding	3	4,5	0,049
GO:0003988	acetyl-CoA C-acyltransferase activity	2	3	0,015
GO:0005102	receptor binding	6	9,1	0,011
GO:0008483	transaminase activity	2	3	0,048
GO:0009055	electron carrier activity	3	4,5	0,046
GO:0016747	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	2	3	0,034
GO:0030170	pyridoxal phosphate binding	3	4,5	0,020
GO:0031698	beta-2 adrenergic receptor binding	2	3	0,015
GO:0032403	protein complex binding	4	6,1	0,043
GO:0044822	poly(A) RNA binding	14	21,2	0,000

^a Número de proteínas del listado introducido en DAVID que tienen este término asociado.

^b Número de proteínas/ número total de proteínas del listado introducido (en porcentaje).