

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERÍA
AGRONÒMICA Y DEL MEDI NATURAL



Efecto transgeneracional de la vitrificación sobre el proteoma de hígado en el modelo conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Marc Muniesa Andreu
TUTOR ACADÉMICO: Francisco Marco Jiménez
DIRECTOR EXPERIMENTAL: Sara Borrás Pérez
CURSO ACADÉMICO: 2017-2018

Valencia, julio 2018



Datos personales

Nombre y apellidos: Marc Muniesa Andreu

Datos del trabajo de fin de grado

Título: Efecto transgeneracional de la vitrificación sobre el proteoma de hígado en el modelo conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor académico: Francisco Marco Jiménez

Director experimental: Sara Borrás Pérez

Lugar de realización: Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA)

Lugar y fecha de lectura: Valencia, julio 2018

Resumen

En la actualidad, las elevadas tasas de infertilidad han propiciado un aumento del uso de las técnicas de reproducción asistida (ARTs), con más de 6,5 millones de nacimientos contabilizados el año 2013. Una herramienta fundamental dentro de las ARTs es la crioconservación, que permite el almacenamiento indefinido de gametos, embriones y tejido reproductivo mediante bajas temperaturas y el uso de crioprotectores. No obstante, diversos estudios recientes llevados a cabo sobre embriones preimplantacionales han demostrado que esta técnica induce modificaciones en el patrón de expresión proteica durante su desarrollo. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar, en el modelo animal conejo, si las modificaciones en el perfil de expresión proteica de tejido hepático pueden ser heredables (transgeneracionales). Para ello el estudio se basa en la comparación de dos poblaciones derivados de individuos vitrificados (V) y control (C) en su segunda generación filial. Con tal fin, se realizó un análisis proteómico mediante espectrometría de masas de muestras hepáticas en individuos adultos de las poblaciones V y C. Se identificaron un total de 1492 proteínas. Tras el análisis con el programa InfernoRDN se obtuvieron 67 proteínas diferencialmente expresadas. De estas, 65 presentaban al menos un "fold change" de 1,2. Del análisis de las rutas KEGG destacar que, de todas las proteínas implicadas, 3 resultaron presentar interacciones (G1TAH7, G1T8G9, P79226), cada una con las otras dos, en rutas metabólicas, metabolismo del carbono, biosíntesis de aminoácidos y biosíntesis de antibióticos; mientras que, por otro lado, 2 proteínas (G1TBU9, G1TES6) presentaron interacciones en biosíntesis de antibióticos y degradación de valina, leucina e isoleucina. Todas estas proteínas se encontraron infra expresadas en las muestras de animales derivados de la vitrificación. De acuerdo con los resultados obtenidos, la técnica de crioconservación de embriones tempranos y su posterior transferencia para generar descendencia induce efectos transgeneracionales en los patrones de síntesis de proteínas del tejido hepático. Estos cambios parecen generar alteraciones del metabolismo lipídico y de los procesos de detoxificación.

Palabras clave

Crioconservación, Vitrificación, Embrión, Transgeneracional, Proteoma, Conejo

Dades personals

Nom i cognoms: Marc Muniesa Andreu

Dades del treball de fi de grau

Títol: Efecte transgeneracional de la vitrificació sobre el proteoma de fetge en el model conill (*Oryctolagus cuniculus*)

Titulació: Grau en Biotecnologia

Tutor acadèmic: Francisco Marco Jiménez

Director experimental: Sara Borrás Pérez

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

Lloc y data de lectura: València, juliol 2018

Resum

En l'actualitat, les elevades taxes d'infertilitat han propiciat un augment de l'ús de les tècniques de reproducció assistida (ARTs), amb més de 6,5 milions de naixements comptabilitzats l'any 2013. Una ferramenta fonamental dins de les ARTs és la crioconservació, que permet l'emmagatzemament indefinit de gàmetes, embrions i teixit reproductiu per mitjà de baixes temperatures i l'ús de crioprotectors. No obstant això, diversos estudis recents duts a terme sobre embrions preimplantacionals han demostrat que esta tècnica induïx modificacions en el patró d'expressió proteica durant el seu desenrotllament. Per això, l'objectiu d'este treball va ser determinar, en el model animal conill, si les modificacions en el perfil d'expressió proteica de teixit hepàtic poden ser heretables (transgeneracionals). Per a això, l'estudi es basa en la comparació de dos poblacions derivats d'individus vitrificats (V) i control (C) en la seua segona generació filial. Amb tal fi, es va realitzar una anàlisi proteòmica per mitjà d'espectrometria de masses de mostres hepàtiques en individus adults de les poblacions V i C. Es van identificar un total de 1492 proteïnes. Després de l'anàlisi amb el programa InfernoRDN es van obtindre 67 proteïnes diferencialment expressades. D'estes, 65 presentaven almenys un fold change de 1,2. De l'anàlisi de les rutes KEGG destacar que, de totes les proteïnes implicades, 3 van resultar presentar interaccions (G1TAH7, G1T8G9, P79226), cada una amb les altres dos, en rutes metabòliques, metabolisme del carboni, biosíntesi d'aminoàcids i biosíntesi d'antibiòtics; mentres que, d'altra banda, 2 proteïnes (G1TBU9, G1TES6) van presentar interaccions en biosíntesi d'antibiòtics i degradació de valina, leucina i isoleucina. Totes estes proteïnes es van trobar infra expressades en les mostres d'animals derivats de la vitrificació. D'acord amb els resultats obtinguts, la tècnica de crioconservació d'embrions primerencs i la seua posterior transferència per a generar descendència induïx efectes transgeneracionals en els patrons de síntesis de proteïnes del teixit hepàtic. Estos canvis pareixen generar alteracions del metabolisme lipídic i dels processos de detoxificació.

Paraules clau

Crioconservació, Vitrificació, Embrió, Transgeneracional, Proteoma, Conill

Personal information

Name and surname: Marc Muniesa Andreu

End of grade work data

Title: Transgenerational effect of vitrification on the liver proteome in the rabbit model (*Oryctolagus cuniculus*)

Degree: Biotechnology

Academic tutor: Francisco Marco Jiménez

Experimental director: Sara Borrás Pérez

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

Place and Reading date: Valencia, July 2018

Abstract

Currently, the high rates of infertility have led to an increase in the use of assisted reproduction techniques (ARTs), with more than 6.5 million births accounted for in 2013. A fundamental tool within ARTs is cryopreservation, that allows the indefinite storage of gametes, embryos and reproductive tissue through low temperatures and the use of cryoprotectants. However, several recent studies carried out on preimplantation embryos have shown that this technique induces modifications in the protein expression pattern during its development. Therefore, the objective of this work was to determine, in the rabbit animal model, whether changes in the protein expression profile of liver tissue can be inherited (transgenerational). For this, the study is based on the comparison of two populations derived from vitrified (V) and control (C) individuals in their second filial generation. For this purpose, a proteomic analysis was carried out by mass spectrometry of liver samples in adult individuals of populations V and C. A total of 1492 proteins were identified. After analysis with the InfernoRDN program, 67 differentially expressed proteins were obtained. Of these, 65 had at least one "fold change" of 1.2. From the analysis of the KEGG routes, it should be noted that, of all the proteins involved, 3 were found to have interactions (G1TAH7, G1T8G9, P79226), each with the other two, in metabolic pathways, carbon metabolism, amino acid biosynthesis and antibiotic biosynthesis; while, on the other hand, 2 proteins (G1TBU9, G1TES6) presented interactions in antibiotic biosynthesis and degradation of valine, leucine and isoleucine. All these proteins were found infra expressed in animal samples derived from vitrification. According to the results obtained, the technique of cryopreservation of early embryos and their subsequent transfer to generate offspring induces transgenerational effects in the protein synthesis patterns of liver tissue. These changes seem to generate alterations in lipid metabolism and detoxification processes.

Key words

Cryopreservation, Vitrification, Embryo, Transgenerational, Proteome, Rabbit

Agradecimientos

A las puertas de finalizar esta etapa de mi vida, llega el momento de reflexionar acerca de todas aquellas personas que han hecho posible que alcanzara una nueva meta. En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor Francisco Marco Jiménez por todo el apoyo aportado a la hora de realizar el trabajo de fin de grado, guiándome y ayudándome en todo momento, haciéndome esta cuesta un poco más fácil. Además, también he sido formado por él en varias asignaturas, de las que puedo garantizar su vocación no sólo en la investigación, sino también en la docencia, contribuyendo a mi interés por la rama animal de la biotecnología.

Por otra parte, quiero agradecer también a Sara Borrás Pérez, sin la orientación de la cual tampoco hubiera sido posible la realización de este trabajo. Su esfuerzo y tiempo dedicado son dignos de elogio, además de aconsejarme para dar lo mejor de mí y animarme durante la realización del trabajo. Agradecer también el apoyo de Ximo García Domínguez en la aclaración de conceptos clave, así como al resto de compañeros del laboratorio que alegremente me acogieron.

Un aspecto clave no sólo en este trabajo, sino en toda mi vida son mi familia y mi novia, que han hecho todo lo posible por ayudarme a lograr los objetivos que me proponía además de mostrarme que incluso podía llegar más allá. Siempre me han animado para superar todos los retos que se me han presentado, siendo un pilar en mi vida que me daba tranquilidad y la seguridad de que con ellos, los momentos difíciles pasarían rápido. Ellos me han ayudado no sólo académicamente, sino que me han educado, y lo siguen haciendo aún a mis 22 años, porque siempre se sigue creciendo, y gracias a ellos estoy realmente feliz del tipo de persona en que me he convertido y sé que en el futuro lo seguiré estando.

No puedo olvidarme tampoco de la ayuda prestada por los amigos y compañeros que he hecho a lo largo de estos 4 años. En especial, Enrique y Emilio, que me han hecho reír cada día que hablaba con ellos y me hacían el día a día más llevadero y alegre, con llamadas exprés antes de los exámenes, tardes de trabajo en que poco se trabajaba, visitas regulares y otras menos esperadas, conversaciones por Whatsapp, etc. apoyándonos todos mutuamente y, en definitiva, creando verdaderas amistades.

Por último, agradecer también el papel de todos aquellos profesores que bien en la universidad, instituto o escuela, demostraban tener pasión por la enseñanza y trataban de dar lo mejor de sí para hacer germinar la semilla de la curiosidad, la base del aprendizaje.

Índice

Índice.....	I
Índice de figuras.....	II
Índice de tablas.....	III
Abreviaturas.....	IV
Anglicismos.....	V
1. Introducción.....	1
1.1 Importancia de las técnicas de reproducción asistida.....	2
1.1.1 Bases de la crioconservación.....	3
1.2 Efecto de la crioconservación sobre el embrión.....	4
1.3 Efecto postnatal de la crioconservación.....	6
1.4 Efecto transgeneracional de la crioconservación.....	7
1.5 Estudio proteómico.....	7
1.5.1 Métodos de realización de un estudio proteómico.....	8
1.5.2 Hígado en el análisis proteómico.....	9
2. Objetivos.....	10
3. Materiales y métodos.....	11
3.1 Animales.....	11
3.2 Diseño experimental.....	11
3.2.1 Recolección de embriones.....	12
3.2.2 Procedimientos de criopreservación y descongelación.....	13
3.2.3 Transferencia de embriones.....	13
3.3 Toma de muestras.....	13
3.4 Ensayo LC-MS/MS.....	14
3.5 Procesado bioinformático de los archivos.....	15
3.5.1 ProteinPilot.....	15
3.5.2 Análisis bioestadístico.....	15
3.5.3 Análisis funcional.....	17
4. Resultados.....	19
4.1 Procesado bioinformático de los datos.....	19
4.1.1 Análisis bioestadístico.....	19
4.1.2 HeatMap y Análisis de Componentes Principales (PCA).....	19
4.1.3 BLAST.....	21
4.2 Análisis funcional.....	22

4.2.1 Clasificación funcional.....	22
4.2.2 Enriquecimiento funcional	23
4.2.3 Rutas KEGG.....	24
4.2.4 Interacciones proteicas	24
5. Discusión	25
6. Conclusiones	29
7. Referencias	30
Anexos.....	38
Anexo I. Proteínas diferencialmente expresadas.....	38
Anexo II. Rutas KEGG.....	39
Anexo III. Términos GO.....	40

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> Fotografía de un par de ejemplares de la línea parental R de raza californiana, la empleada para la obtención de los embriones.....	1
<i>Figura 2.</i> Fotografía de un riñón de conejo congelado (izquierda) y otro vitrificado (derecha). Aunque el órgano logra ser vitrificado, las concentraciones de crioprotectores necesarias son tan elevadas que no son compatibles biológicamente.....	4
<i>Figura 3.</i> Diagrama experimental seguido en este estudio.....	12
<i>Figura 4.</i> Fotografía de embriones de conejo en estadio de morula tardía y blastocisto temprano	12
<i>Figura 5.</i> Heatmap obtenido del clustering de las muestras hepáticas de conejo de la comparación Fresco (C) vs Vitrificado (V) en base a las proteínas diferencialmente expresadas. Se observan dos grupos, con las muestras de poblaciones vitrificadas agrupadas a la izquierda (C4, C3, C1, C2; amarillo) y las de poblaciones no vitrificadas a la derecha (V2, V3, V1, V4; morado).....	20
<i>Figura 6.</i> Gráfico de dispersión obtenido a partir del Análisis de Componentes Principales (ACP) de las proteínas diferencialmente expresadas en muestras hepáticas de conejo en la comparación Fresco vs Vitrificado. La primera componente principal (CP1; 64,2%) separa las muestras de la población F y V. La segunda componente principal (CP2; 9,29%) explica la variabilidad en la agrupación de las muestras, con mayor diversidad entre las muestras del grupo F y con patrones de expresión proteica más comunes entre las muestras del grupo V. En total, el ACP explica un 73,5% de la variabilidad.....	21
<i>Figura 7.</i> Diagrama de columnas indicando los porcentajes de las proteínas implicadas (azul) en cada una de las tres ontologías génicas respecto las 63 proteínas diferencialmente expresadas totales.....	23

Índice de tablas

Tabla 1. Cantidad de proteínas diferencialmente expresadas en F vs V que aumentan o disminuyen la expresión x2 o más (Fold change superior o igual a 1, o inferior o igual a -0,5) y de proteínas que aumentan o disminuyen la expresión x1,2 o más (Fold change entre 0,2 y 1 o entre -0,17 y -0,5). Porcentajes obtenidos respecto las 65 proteínas totales.....19

Tabla 2. De izquierda a derecha: número de proteínas restantes tras cada paso de selección, porcentaje de proteínas que han pasado respecto el total inicial y porcentaje de proteínas que logran superar cada paso respecto el anterior.....22

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ART	Técnicas de reproducción asistida
BSA	Albúmina sérica bovina
C-G0	Población inicial control
C-G1	Primera generación filial derivada de control
C-G2	Segunda generación filial derivada de control, posteriormente referida como C
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxiribonucleico
DPBS	Tampón fosfato salino de Dulbecco
DTT	Diotioteitol
ED	Energía digestible
Electrofóresis 2D	Electrofóresis bidimensional (isoelectroenfoque mas SDS-PAGE)
ESI	Ionización por electroespray
FA	Ácido fórmico
FC	Fold change
FIV	Fecundación in vitro
G2	Segunda generación filial
GIFT	Transferencia intrafalopiana de gametos
GO	Ontología génica
HOC	Hiperestimulación ovárica controlada
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAM	Iodoacetamina
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IUGR	Restricción del crecimiento intrauterino
m/z	Relación masa/carga
MALDI	Ionización por desorción en matriz asistida por láser
MJ	Mega julios
MS	Espectrometría de masas
MS	En el apartado 3.1 la abreviatura MS indica materia seca en lugar de espectrometría de masas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PC1	Componente principal 1
PC2	Componente Principal 2
PCA	Análisis de componentes principales
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
SDS-PAGE	Electrofóresis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
UGTs	UDP-Glucosiltransferasas
UPV	Universidad Politécnica de Valencia
v/v	Relación volumen/volumen
V-G0	Población inicial vitrificada
V-G1	Primera generación filial derivada de vitrificado
V-G2	Segunda generación filial derivada de vitrificado, posteriormente referida como V

Anglicismos

Bottom-up	Vertiente de análisis proteómico en que se realiza una fragmentación peptídica generalmente mediante proteasas como la tripsina, facilitando la detección proteica en las bases de datos.
Clusters	Cada uno de los grupos generados por el HeatMap
Complete linkage	Método escogido en este estudio en que se basa el algoritmo de agrupamiento jerárquico.
HeatMap	Representación gráfica mediante colores conocida como mapa de calor, que genera grupos en una matriz según la similitud de las variables comparadas entre muestras.
Hit	Cada uno de los genes detectados por el BLAST para un identificador dado.
Label-free	Método de cuantificación realizada en los análisis proteómicos mediante espectrometría de masas sin el empleo de marcaje, a partir del área de los picos generados para cada ión proteico.
Run	Cada una de las veces que se realiza un BLAST.
Score	Puntuación dada a cada una de las secuencias detectadas por el BLAST para un identificador introducido. A mayor score mayor homología de secuencias.
Top-down	Vertiente de análisis proteómico en que no se realiza una fragmentación de las proteínas en péptidos, permitiendo diferenciar isoformas y modificaciones postraduccionales.
t-Test	Análisis estadístico en que, si se cumple la hipótesis nula, se observa una distribución T.

1. Introducción

El conejo común (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie de gran relevancia científica, puesto que, de los cerca de 11,5 millones de animales empleados en investigación en la Unión Europea en 2013, un 3,12% eran conejos, siendo sólo superado por los roedores: ratón (60,9%) y rata (13,9%) (EU Report, 2013). Se trata de un animal con amplios usos en investigación biomédica como es la producción de anticuerpos o la evaluación de la toxicidad de distintos agentes químicos, empleándose extensamente en la actualidad como modelo de la aterosclerosis e hipercolesterolemia gracias a la semejanza de su metabolismo lipídico con el humano (Houdebine y Fan, 2009). Otro de los ámbitos en el que destaca es en el de la embriología, con gran similitud a humanos en comparación con los ratones o las ratas, observándose, por ejemplo, el efecto teratogénico de la talidomida en conejo, pero no en los anteriores roedores (Fischer *et al.*, 2012).

Así pues, presenta numerosas ventajas en dicho campo, como es una morfología arquetípica de mamíferos durante gran parte del desarrollo uterino, una implantación tardía que facilita el acceso en las etapas de desarrollo temprano, así como una ovulación inducida durante el coito que permite el control preciso de los tiempos de gestación (Puschel *et al.*, 2010). Además, presenta camadas de alrededor de 8-9 individuos que se gestan en apenas un mes y cuyas hembras alcanzan la madurez sexual cerca de los 4-5 meses de vida (Fischer *et al.*, 2012). Por tanto, el conejo se antepone como el modelo animal más pequeño y menos costoso en el que medir efectos toxicológicos y reproductivos evaluables en animales más grandes, como el ser humano (Foote y Carney, 2000).



Figura 1. Fotografía de un par de ejemplares de la línea parental R de origen californiana, la empleada para la obtención de los embriones.

1.1 Importancia de las técnicas de reproducción asistida

En la actualidad, se calcula que la prevalencia de la infertilidad en los países desarrollados es de entre 6,9 - 9,3%, mientras que en los países en desarrollo esta cifra puede alcanzar el 16,7% (Bahamondes y Makuch, 2014). Esto implicaría que existen unos 186 millones de personas en la actualidad que presentan problemas de fertilidad (Inhorn y Patrizio, 2015) y que requerirán el uso de estas técnicas para tener descendencia.

Desde el nacimiento del primer bebé por fecundación in vitro en 1978 (Cohen *et al.*, 2005), las técnicas de reproducción asistida (ART, de sus siglas en inglés “assisted reproduction techniques”) han permitido que, ya en 2013, se estimaran más de 6,5 millones de nacimientos a nivel mundial mediante fecundación in vitro (FIV), transferencia intrafalopiana de gametos (GIFT) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (ESHRE, 2017). Además, se estima que para finales de siglo los individuos nacidos por estas técnicas supondrán entre un 1,4 y 3,5% (157 - 394 millones de personas) de la población mundial total para ese entonces (Faddy *et al.*, 2018).

Resaltar que dentro de las ARTs, la crioconservación embrionaria es un método cada vez más empleado en comparación al uso de embriones frescos (Kushnir *et al.*, 2017) con 110.117 ciclos de transferencia de embriones congelados en Europa el año 2010 (EIM and ICMART data reports, 2013). El uso de embriones congelados para transferencia de embriones individuales ha supuesto grandes avances como evitar las gestaciones múltiples debidas a la transferencia de numerosos embriones frescos, pudiendo almacenarlos para posteriores ciclos en caso de no tener éxito (Tiitinen *et al.*, 2001; Thurin *et al.*, 2004), así como permitir la donación de estos (Alizadeh y Samani, 2014). Además, otra característica de gran utilidad ha sido la de evitar los posibles efectos negativos de la estimulación ovárica sobre el endometrio, que afecta a la implantación y la gestación (Davenport *et al.*, 2017; Aflatoonian *et al.*, 2018).

Uno de los ámbitos a los que se ha extendido también la crioconservación es la preservación de tejido ovárico en los casos en los que se puede ver dañado por un tratamiento de quimioterapia o radioterapia (Newton, 1998; Fleury *et al.*, 2018). Este es el caso, por ejemplo, de las pacientes prepúberes con cáncer o púberes con poco tiempo entre el diagnóstico y el inicio del tratamiento, habiéndose observado una disminución de las reservas ováricas en el 90% de los casos o fallo ovárico prematuro durante 5 años desde el tratamiento gonadotóxico en el 30% de los casos (Imbert *et al.*, 2014).

Las aplicaciones de la crioconservación han encontrado también un lugar en la conservación de especies en peligro de extinción con la construcción de criobancos dedicados, como es el caso del Lince Ibérico (Leon-Quinto *et al.*, 2009). Esta, resulta pues una herramienta clave en la preservación de la biodiversidad, habiéndose reducido la abundancia de vertebrados un 58 % entre los años 1970 y 2012 (McRae *et al.*, 2016). Destaca también la practicidad en el transporte

de gametos y/o embriones crioconservados para preservar la diversidad genética en lugar del transporte del propio animal (Hermes *et al.*, 2013), evitando además el estrés del trayecto que, por ejemplo, en el caso de los elefantes, aumenta la probabilidad de morir (Clubb *et al.*, 2008). Otro de los usos de las técnicas de crioconservación es el mantenimiento de líneas animales específicas minimizando el efecto de la deriva genética o la propia selección natural, pudiendo evaluar también la mejora genética de cierta línea al disponer de un control crioconservado (Santacreu *et al.*, 2005). Más factores que se logran evitar son las posibles muertes accidentales, propagación de patógenos, el escape de los animales (Nakao y Inoue, 2010) o las mutaciones silenciosas (Stevens *et al.*, 2007).

No obstante, a pesar de la extensión en la aplicación de las técnicas de reproducción asistida, recientemente se ha observado que las ARTs parecen inducir cambios en los embriones, con desórdenes en la impronta, mayor predisposición a hipertensión, diabetes o nacimientos pretérmino y de menor peso para el período gestacional (Calle *et al.*, 2012; Ventura-Juncá *et al.*, 2015; Feuer y Rinaudo, 2017; Vrooman y Bartolomei, 2017). A esto, cabe añadir que las técnicas de crioconservación, consideradas anteriormente neutras (Testart, 1998; Auroux *et al.*, 2004), han resultado provocar cambios en el individuo (Wang *et al.*, 2010; Saenz-de-Juano *et al.*, 2012; Marco-Jiménez *et al.*, 2013), los cuales pueden llegar a ser heredados por la descendencia (Lavara *et al.*, 2014).

1.1.1 Bases de la crioconservación

La criobiología, ciencia dedicada al estudio de los efectos de las bajas temperaturas sobre los seres vivos, aplicada a la conservación del material biológico manteniendo su viabilidad tras los pasos de congelación y calentamiento posterior, da inicio en 1949 con la aparición de la congelación lenta (Polge *et al.*, 1949). Las técnicas de crioconservación tuvieron que hacer frente a dos problemas principales al trabajar con temperaturas por debajo de los cero grados: daños físicos provocados por la formación de hielo y daños químicos resultantes por los cambios intracelulares en la concentración de solutos (Mandawala *et al.*, 2016). A su vez, la supervivencia celular variará tras el proceso criológico según el tipo de célula, la velocidad de enfriamiento, de calentamiento y la composición del medio (Wilmut, 1972). En un primer momento se desarrollaría la congelación lenta, que hace uso de bajas concentraciones de crioprotectores (menos del 10%) como el dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol o la sacarosa y velocidades de enfriamiento bajas para promover la deshidratación celular lenta, sin daño osmótico, evitando la formación de hielo intracelular (Mazur, 1963; Leibo, 2008). Así, un ejemplo sería un enfriamiento de entre 0,5 – 2°C/min hasta alcanzar los -5 a -7°C, y después se proseguiría a razón de 0,3 – 0,5°C/min hasta alcanzar los -30 – -65°C, momento en que las muestras se almacenarían en nitrógeno líquido, hasta su descongelación con un baño en agua a 20 – 25°C (Leibo, 2008; Saragusty y Arav, 2011).

Posteriormente, en 1985 se desarrolla la técnica denominada vitrificación como método alternativo a la congelación lenta (Rall y Fahy, 1985). Esta técnica evita la formación de hielo, pasando el agua a un estado vítreo, esto es, un cristal amorfo; haciendo uso de altas concentraciones de crioprotectores que aumentan la viscosidad, así como velocidades de enfriamiento igualmente elevadas (Dobrinsky, 1996). En este caso, la muestra se introduce a temperatura ambiente en nitrógeno líquido a -196°C , lo que conlleva velocidades de enfriamiento de más de 5000°C por minuto y de igual modo con velocidades de calentamiento en la desvitrificación, mediante baño en agua a 35°C (Vajta y Kuwayama, 2006; Gupta *et al.*, 2016). No obstante, el uso de altas concentraciones de crioprotectores puede resultar tóxico o producir daño osmótico, por lo que se han dedicado esfuerzos a minimizar estos problemas usando soluciones más efectivas y dispositivos que permiten mejores velocidades de enfriamiento, haciendo de ésta una técnica más exitosa en la crioconservación de embriones con mayor supervivencia y ratios de implantación que la congelación lenta (Rezazadeh Valojerdi *et al.*, 2009; Levron *et al.*, 2014).

Es importante destacar que los gametos femeninos (óvulos y embriones) presentan grandes diferencias frente a la conservación de los gametos masculinos (espermatozoides), debido fundamentalmente a las desigualdades en tamaño, composición y estructuras asociadas, que los convierten en un reto para la crioconservación, provocando que el primer embrión murino conservado con éxito se diese a principios de los años 70 (Whittingham, 1971), dos décadas tras el logro de la conservación de espermatozoides (Polge *et al.*, 1956). Así, indicar que actualmente son numerosas las especies animales que carecen de protocolos óptimos de crioconservación embrionaria (Prentice y Anzar, 2011).



Figura 2. Fotografía de un riñón de conejo congelado (izquierda) y otro vitrificado (derecha). Aunque el órgano logra ser vitrificado, las concentraciones de crioprotectores necesarias son tan elevadas que no son compatibles biológicamente.

1.2 Efecto de la crioconservación sobre el embrión

El uso de las técnicas de crioconservación, tanto congelación lenta como vitrificación, han supuesto grandes avances en las técnicas de reproducción asistida al permitir la conservación de células germinales y embriones durante períodos de tiempo sumamente prolongados, que

teóricamente podrían extenderse durante más de 1000 años (Mazur, 1988; Tucker y Liebermann, 2015). En los últimos años los datos publicados, aunque relativamente limitados, han demostrado que la criopreservación a largo plazo no parece tener efectos adversos sobre la supervivencia post-descongelación, tasas de implantación, embarazo clínico, abortos espontáneos y nacidos vivos (hasta 20 años en humanos (Riggs *et al.*, 2010), 3 años en cerdos (Sánchez-Osorio *et al.*, 2010), después de 15 años en bovinos (Fang *et al.*, 2014), después de 13 años en ovejas (Fogarty *et al.*, 2000) y después de 15 años en conejos (Lavara *et al.*, 2011)).

No obstante, desde el inicio de su aplicación, siempre se ha considerado que esta técnica tenía un efecto neutro sobre el individuo generado (Testart, 1998; Auroux *et al.*, 2004), pero con la aparición de nuevas tecnologías de secuenciación y el desarrollo de las ciencias “ómicas”, se empezó a poner este hecho en entredicho (Varghese *et al.*, 2009). En la actualidad existen varios estudios en ratón y conejo que demuestran que la crioconservación sí provoca cambios en los patrones de expresión del embrión (Mamo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Saenz-de-Juano *et al.*, 2012), con consecuencias apreciables de forma temprana con menores ratios de implantación y nacimientos en aquellos que han sobrevivido al procedimiento de vitrificación (al-Hasani *et al.*, 1992; Saenz-de-Juano *et al.*, 2014). En concreto, en el modelo animal conejo, se ha apreciado también diferencias a nivel transcripcional y proteómico en la placenta a mitad de la gestación, observándose así mismo un menor tamaño en fetos y placentas de embriones vitrificados que en el grupo control a los 14 días tras la implantación (Saenz-de-Juano *et al.*, 2014). Estas modificaciones, podrían estar provocadas por la gran plasticidad del embrión de mamíferos para adaptarse a condiciones ambientales desfavorables, involucrando en el proceso cambios en los eventos de reprogramación epigenética como son la metilación de novo durante la gametogénesis, posterior desmetilación de los pronúcleos tras la fertilización y remetilación del embrión tras la implantación (Kohda y Ishino, 2012; Vrooman y Bartolomei, 2017), pudiendo dar lugar a alteraciones fenotípicas en el estado adulto (Ventura-Juncá *et al.*, 2015). Entre los factores que se cree asociados a estos cambios se encontrarían principalmente las bajas temperaturas del proceso junto al uso de los crioprotectores (Larman *et al.*, 2011), el dispositivo de vitrificación empleado (Marco-Jiménez *et al.*, 2013), así como la propia manipulación del embrión (Kohda y Ishino, 2012; Saenz de Juano *et al.*, 2016).

Por otra parte, es muy frecuente que la crioconservación del embrión venga acompañada de alguna técnica de reproducción asistida como la fecundación in vitro (FIV) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), como ocurre para cualquier embrión humano. En estos casos añadiríamos factores como la composición del medio de cultivo (Nelissen *et al.*, 2012; Kleijkers *et al.*, 2016), la técnica de fertilización empleada (Kohda y Ishino, 2012) la concentración de oxígeno (Rinaudo *et al.*, 2006) o la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) que experimenta

la madre (Chu *et al.*, 2012); coincidiendo la HOC con la metilación de novo del ovocito; y la transferencia, el cultivo in vitro y la propia vitrificación, con la desmetilación del embrión.

En cuanto a los mecanismos por los que estas modificaciones tienen lugar, se ha sugerido que consistirían en cambios postraduccionales de histonas y en los patrones de metilación del ADN (Ventura-Juncá *et al.*, 2015; Chavatte-Palmer *et al.*, 2016a) coincidiendo con los estadios en los que el óvulo y el embrión están sufriendo numerosas reprogramaciones de su epigenoma (Kohda y Ishino, 2012; Vrooman y Bartolomei, 2017). Así se ha sugerido que esto afectaría a su vez la inactivación del cromosoma X, la impronta genética, fundamental en el desarrollo placentario y fetal al estar asociados desórdenes de esta con varias enfermedades como, por ejemplo, la restricción de crecimiento intrauterino (IUGR) (Ishida y Moore, 2013), y por la cual cierto gen se expresa dependiendo de si proviene del padre o la madre; así como zonas repetitivas de DNA no codificante o elementos transponibles que, en ocasiones, actúan como promotores alternativos para ciertos genes (Calle *et al.*, 2012).

1.3 Efecto postnatal de la crioconservación

Además de los efectos mencionados a nivel embrionario, se han sugerido diferencias en los individuos crioconservados en el momento del nacimiento, pudiendo mantenerse incluso en los individuos adultos. Así, a nivel perinatal, hay indicios de que la crioconservación puede provocar una mayor probabilidad de nacimientos con un tamaño mayor del normal, peso mayor, y post término; al contrario de lo que ocurre si tan sólo se hace FIV o ICSI, en que hay mayor probabilidad de nacimientos pretérmino, de menor peso y menor tamaño para su edad gestacional (Wennerholm *et al.*, 2013; Pinborg *et al.*, 2014). No obstante, aunque estos estudios tratan de disminuir la variabilidad analizando hermanos concebidos por FIV o ICSI y por crioconservación, sigue existiendo una gran variabilidad como la nutrición seguida por las madres, exposición a contaminantes, estrés, etc. que, en cambio, pueden ser controladas adecuadamente en estudios con modelos animales (Chavatte-Palmer *et al.*, 2016b). Además, también se ha visto que factores que provocan cambios en el embrión tales como el medio de cultivo, provocan efectos similares a los experimentados tras la crioconservación (Kleijkers *et al.*, 2014) cómo es el conocido síndrome de descendencia grande en rumiantes (McEvoy *et al.*, 2000). En el caso del modelo conejo, aunque también se ha visto un mayor peso al nacer en individuos vitrificados, tras el periodo de lactación se produce una inversión del efecto, siendo los animales concebidos de forma natural los que presentan un mayor peso corporal (Lavara *et al.*, 2015).

Respecto a los efectos sobre individuos adultos, en el modelo ratón se han identificado diferencias de comportamiento, así como en la morfología de la mandíbula (Dulioust *et al.*, 1995). En el modelo conejo, la vitrificación parece provocar un efecto positivo sobre la capacidad reproductiva de las hembras, con un mayor tamaño de la camada y número de individuos que

nacen vivos (Lavara *et al.*, 2014). Además, se ha observado un efecto positivo en la longevidad de los individuos crioconservados al tener menor riesgo de sufrir cáncer de vejiga urinaria inducido con carcinógenos (Auroux *et al.*, 2004).

1.4 Efecto transgeneracional de la crioconservación

Frente a los estudios anteriormente citados, centrados en los cambios a nivel embrionario, tras el nacimiento o en el individuo adulto, otros estudios han tratado de comprobar si estas diferencias pueden tener un carácter heredable o transgeneracional. La importancia sobre el estudio de la heredabilidad de los efectos de la crioconservación en embriones reside en el hecho que las modificaciones epigenéticas provocadas en un individuo pueden ser transmitidas a la descendencia (Kovalchuk, 2012). Si bien los estudios sobre el efecto transgeneracional son escasos, en embriones de ratón cultivados *in vitro* se demostró que el tamaño de los órganos presentaba modificaciones en la segunda generación filial (Mahsoudi *et al.*, 2007). En conejo, se ha observado que la primera generación filial embrionaria presentaba las mismas mejoras reproductivas observadas en la población vitrificada con un mayor tamaño de la camada y nacimientos vivos (Lavara *et al.*, 2014).

No obstante, es importante tener en cuenta que, aunque se observen cambios que son transmitidos a la siguiente generación, ello no asegura que se trate de modificaciones epigenéticas heredables, puesto que en el momento de la crioconservación se está produciendo no sólo un efecto directo sobre el embrión sino también sobre sus gametos (Skinner, 2008; Martos *et al.*, 2015). Así pues, estudios sobre las posteriores generaciones son necesarios para probar la existencia de efectos no sólo intergeneracionales, sino transgeneracionales.

1.5 Estudio proteómico

Las células presentan multitud de procesos moleculares interrelacionados que gobiernan el crecimiento celular, la reproducción, y la supervivencia. Todos estos procesos son llevados a cabo principalmente por moléculas proteicas cuya actividad se controla según su biosíntesis, degradación y modificaciones postraduccionales, de las que se conocen más de 300 tipos diferentes (Nørregaard, 2004). A esta complejidad cabe sumar que, aunque se estima que el genoma humano tiene unos 20.000 – 25.000 genes, y unos 100.000 transcritos, se cree que el número de proteínas distintas supera el millón (Moseley, 2013). Hasta hace no mucho, los estudios proteicos centraban los experimentos en una o pocas proteínas concretas o, a lo sumo, en una ruta metabólica en especial (Garrels, 2001). No fue hasta comienzos de la década de los 90 que, junto con el avance de la genómica gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, se pudo comenzar a pasar a un nivel de estudio superior al transcriptómico: el proteómico (Karpievitch *et al.*, 2010).

En la actualidad, el término “proteómica” representa el estudio del repertorio total de proteínas presentes en una muestra en un tiempo dado y bajo condiciones concretas, siendo de gran importancia en la medición de la expresión proteica, dado que la cantidad del ácido ribonucleico RNA mensajero (RNAm) presente para un gen, y que determina la expresión génica, no tiene por qué corresponderse con la cantidad de proteína real (Garrels, 2001). Es por ello que la proteómica resulta una herramienta clave para el estudio de los complejos proteicos, modificaciones postraduccionales, mecanismos de infección y mecanismos de respuesta quimioterapéutica, así como la detección y verificación de nuevos biomarcadores con un gran impacto en medicina (Moseley, 2013).

1.5.1 Métodos de realización de un estudio proteómico

Las bases de la proteómica se remontan a 1974, en que se combinan por primera vez la tecnología del isoelectroenfoque (separar proteínas por su punto isoeléctrico) y la electroforesis en gel SDS-PAGE para obtener la técnica conocida como electroforesis 2D o bidimensional. Esta técnica junto al uso del azul de Coomassie o el marcaje radiactivo consiguieron la separación de cerca de 1500 spots proteicos, aunque el resultado obtenido resultaba muy poco informativo y de baja reproducibilidad, esta última solventada con la posterior invención de los gradientes inmovilizados de pH (Rabilloud, 2014). Aunque todavía hoy se emplea la electroforesis 2D, sobre todo para expresión diferencial, la espectrometría de masas (MS) ha demostrado ser sumamente efectiva en la caracterización de proteínas y en el análisis de muestras proteicas complejas (Karpievitch *et al.*, 2010). La espectrometría de masas requiere de la ionización de las moléculas a estudiar para poder medir su relación masa-carga (m/z) y su paso a una fase gaseosa, por lo que el estudio de proteínas no pudo realizarse hasta el desarrollo de técnicas como la ionización por electrospray (ESI) y la ionización por desorción en matriz asistida por láser (MALDI), esta última clave para las grandes macromoléculas (Thelen, 2007).

Normalmente, la espectrometría de masas viene acompañada de un paso previo de separación de las proteínas de la muestra para facilitar su detección. Una de las técnicas más extendidas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), consistente en una columna apolar, conocida como fase estacionaria, por la que se hace pasar nuestra muestra disuelta en la fase móvil polar a altas presiones. Según la polaridad de los péptidos estos se retendrán en mayor o menor medida en la columna, saliendo a tiempos distintos, llegando después al MS donde se ionizan, separan por relación m/z en el analizador, y se mide su intensidad en el detector, generando el espectro primario (Karpievitch *et al.*, 2010). A partir de este punto se distinguen dos vertientes de análisis: el ensayo “top-down” y el “bottom-up”. El primero, consistente en un análisis de las proteínas intactas, sin fragmentar; lo que provee información acerca del procesamiento postraducciona, así como de la isoforma original, con la desventaja de que requiere de gran precisión y resolución (Angel *et al.*, 2012). El segundo y más extendido, se basa por el contrario en

la fragmentación enzimática o química de las proteínas y el análisis de los péptidos resultantes en el MS, acoplada normalmente a otro MS. Se obtiene así un segundo espectro por fragmentación de los anteriores péptidos por colisión electrónica, quedando un ensayo HPLC/MS/MS. Con esto se logra más información para identificar correctamente las proteínas en las bases de datos genómicas (Angel *et al.*, 2012; Moseley, 2013).

1.5.2 Hígado en el análisis proteómico

El hígado es el principal centro metabólico del cuerpo de los mamíferos. Se trata del órgano interno de mayor tamaño, implicado en funciones tales como el metabolismo de los ácidos grasos, los aminoácidos, los carbohidratos y la síntesis de ácido biliar y hormonas, así como detoxificación y biogénesis de lipoproteínas. Por otro lado, se trata de una estructura muy homogénea con alrededor de un 90% del volumen de este constituido por hepatocitos (Azimifar *et al.*, 2014).

Esto, sumado al hecho de que en estudios anteriores se han visto alteraciones en el tamaño del hígado de conejo asociado al efecto de la crioconservación (Lavara *et al.*, 2015) así como cambios en los patrones de expresión de proteínas (Redondo, 2014) llevan a la elección de este órgano para su estudio proteómico.

2. Objetivos

Este trabajo tiene por objetivo evaluar si el proceso de crioconservación embrionaria temprana provoca cambios heredables en el proteoma de tejido hepático de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en individuos adultos y, si se da el caso, qué tipo de modificaciones se han experimentado y sus posibles implicaciones.

3. Materiales y métodos

3.1 Animales

Durante este estudio, todos los procesos experimentales que implican animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la Directiva 2010/63/EU EEC del Consejo y Parlamento Europeos, así como revisados y aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universitat Politècnica de València (UPV), España (código de investigación: 2015/VSC/PEA/00061). Los ejemplares empleados pertenecen a la línea paternal R de raza californiana desarrollada en el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la UPV.

Los animales fueron alojados en la granja experimental de la UPV en jaulas interiores de plataforma plana (75x50x30 cm), con libre acceso al agua y dietas de pellet comercial (mínimo de 15 g de proteína cruda por kg de materia seca (MS), 15 g de fibra por kg de MS y 10.2 MJ de energía digestible (ED) por kg de MS. El fotoperíodo se configuró para proporcionar 16 h de luz y 8 h de oscuridad, y la temperatura ambiente se reguló para mantenerse entre 10 ° C y 28 ° C.

3.2 Diseño experimental

En este estudio se han utilizado dos grupos experimentales, conejos de la segunda generación filial (G2) derivados de una población de embriones sometidos a un proceso de vitrificación (V) y una población de conejos control que fueron concebidos de forma natural (C) (**Figura 3**). Para la obtención de estos grupos se ha partido de cruzamientos entre machos y hembras de la línea R, y la posterior subdivisión de las hembras en dos grupos según se dirigirían sus embriones a criopreservación y transferencia para generar una subpoblación (V-G0) o animales que fueron reproducidos de forma natural sin manipulación alguna (C-G0). Tras las primeras 4 semanas se procedió al destete de la camada, y a las 20 semanas se realizaron nuevos entrecruzamientos dentro de cada uno de los grupos para obtener la siguiente generación filial (V-G1 y C-G1). De igual forma, cuando los animales alcanzaron la madurez sexual se realizaron nuevos entrecruzamientos dentro de cada uno de los grupos experimentales obteniendo así la siguiente generación filial (V-G2 y C-G2) objeto del presente estudio. En el caso de los embriones que se dirigirían hacia el procedimiento de vitrificación, fue necesaria su recuperación previa a partir de las hembras de la línea R, subsiguiente vitrificación y desvitrificación, así como transferencia a madres subrogadas pertenecientes a línea maternal A.

Para los entrecruzamientos se emplearon 25 machos y 125 hembras, siendo el tamaño de población mínimo en conejo con el que controlando los cruces se logra una ganancia de consanguinidad por generación inferior al 1% al evitar que los cruces no se produzcan cuando existan abuelos comunes (Ragab *et al.*, 2015).

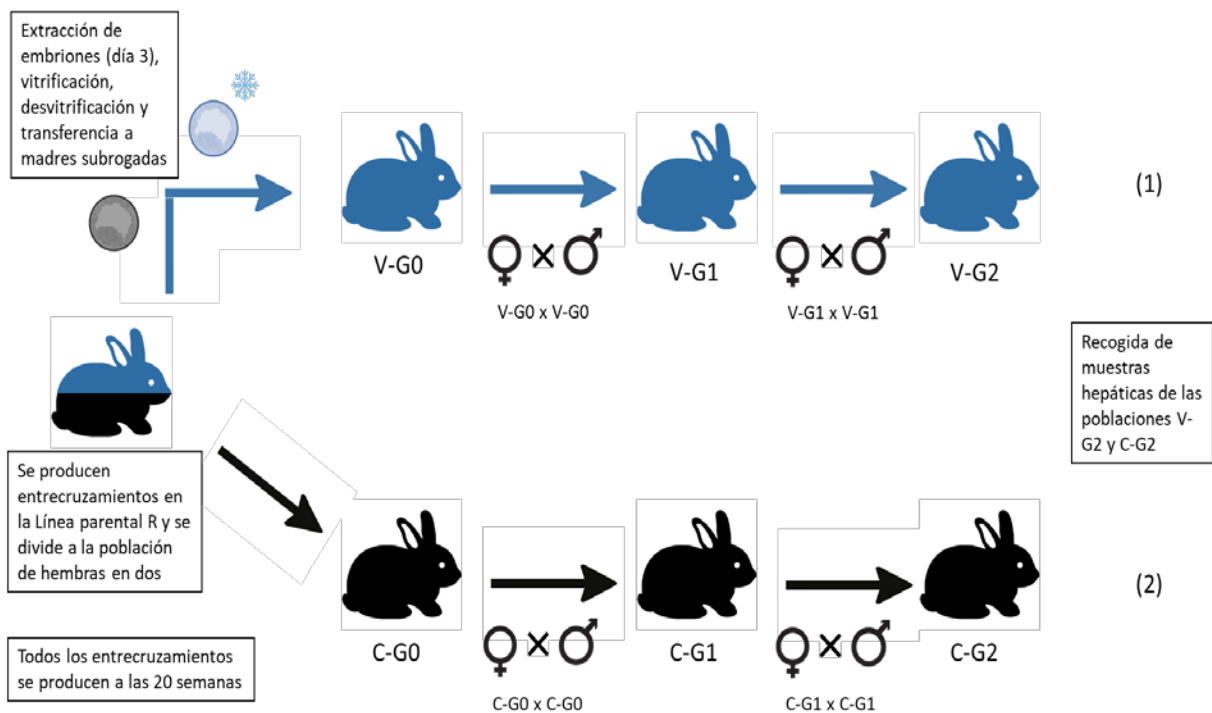


Figura 3. Diagrama experimental seguido en este estudio.

3.2.1 Recolección de embriones

La recuperación de los embriones se realizó por perfusión de los oviductos de hembras de la línea sintética R eutanasiadas a las 72 horas post inseminación (Redondo, 2014), momento en que el embrión se encuentra en la etapa de mórula tardía-blastocisto temprano (Figura 4), con 0,6 g de pentobarbital sódico (Doletal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Madrid, España). En la perfusión se empleó un tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS) suplementado con 0,2% (v/v) de albúmina sérica bovina (BSA).

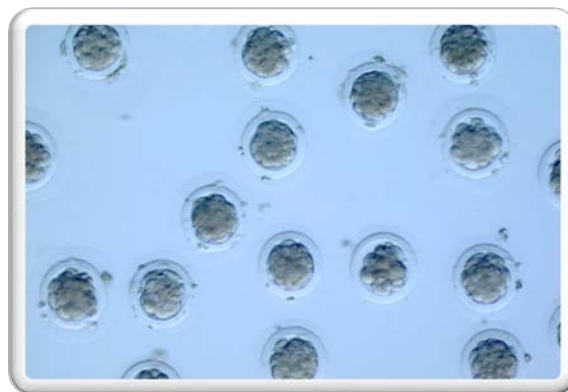


Figura 4. Fotografía de embriones de conejo en estadio de morula tardía y blastocisto temprano.

3.2.2 Procedimientos de criopreservación y descongelación

Tras la obtención de los embriones, se llevó a cabo la vitrificación de estos utilizando el protocolo descrito por Vicente *et al.* (1999). En la metodología seguida se emplea una solución crioprotectora 1:1:2 (v/v/v) de dimetilsulfóxido (3.5 M DMSO, Sigma D5879), etilenglicol (4.4 M EG, Sigma 9129) y DPBS (D1283). Así pues, se tomaron 0,2 mL de los embriones perfundidos en DPBS y se les adicionó 0,2 mL de la solución de vitrificación durante 2 minutos. Después se añadieron otros 0,6 mL de solución de vitrificación y se mantuvo menos de 1 minuto antes de sumergir los embriones en nitrógeno líquido.

Los embriones fueron almacenados durante un año y, transcurrido ese tiempo, se realizó la descongelación de los embriones mediante baño en agua a 20°C durante 10 - 15 s. La eliminación de los crioprotectores se realizó en dos pasos de dilución: primeramente, se añade 0,1 mL de embriones suspendidos en la solución de vitrificación final en 1 mL de DPBS con sacarosa 0,33 M durante 2 minutos, y después se pasan los embriones a una solución de DPBS fresca. Por último, se examinan morfológicamente y se seleccionan aquellos con una masa celular interna y zona pelúcida en buen estado.

3.2.3 Transferencia de embriones

La transferencia de los embriones de la línea paternal R a las hembras de la línea maternal A se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Besenfelder y Brem (1993). Entre 64-66 horas antes de la transferencia se les administró intramuscularmente 1 µg de acetato de busirilina (Hoechst, Marion Roussel, Madrid, Spain) a las hembras receptoras para inducir la ovulación y sincronizarlas así con las donantes. Primeramente, se procedió con la sedación de los animales receptores administrando una anestesia intramuscular de 4 mg/Kg de xilacina (Bayer AG, Leverkusen, Alemania), seguida de una inyección intravenosa tras 5 - 10 minutos de 0,4 mL/Kg de hidrocloreuro de ketamina (Imalgène 500, Merial SA, Lyon, Francia) (Marco-Jiménez *et al.*, 2016). Tras esto, se realizó una laparoscopia en las hembras receptoras, depositando los embriones en ambos oviductos. Durante el proceso, el animal se dispuso sobre una camilla inclinada, sujetado por las 4 patas y con la cabeza en la parte inferior para mayor accesibilidad a los infundíbulos. Una vez realizada la transferencia, se les trató con antibióticos y analgésicos durante los siguientes 3 días.

3.3 Toma de muestras

Para la obtención de las muestras, se seleccionaron 4 machos no emparentados de la población derivada de animales vitrificados (V) y del grupo control (C) en edad adulta (8 meses). Los 8 ejemplares fueron sacrificados mediante la inyección de 0,6 g de pentobarbital sódico, y se extrajeron sus hígados. De cada uno de estos se tomaron muestras de pequeño tamaño, evitando

la contaminación con otros tejidos, que fueron sumergidas en nitrógeno líquido para un posterior almacenamiento a -80°C hasta el momento de su uso.

El procesado de las muestras inicia en primer lugar con la disgregación del tejido durante la homogenización, obteniendo $40\ \mu\text{g}$ por muestra en $22,5\ \mu\text{L}$ de volumen con bicarbonato amónico (ABC) $50\ \text{mM}$. Seguidamente, se llevó a cabo la reducción de los puentes disulfuro mediante un agente reductor, diotiotreitol (DTT) $2\ \text{mM}$, en $50\ \text{mM}$ de ABS hasta un volumen de $25\ \mu\text{L}$ incubando durante 20 minutos a 60°C . A continuación, se alquilaron las cisteínas a temperatura ambiente durante 30 minutos con Iodoacetamida (IAM) $5.5\ \text{mM}$ en ABS $50\ \text{mM}$ hasta un volumen final de $30\ \mu\text{L}$ para evitar la restauración de los puentes disulfuro. Posteriormente se procedió con la digestión enzimática haciendo uso de la proteasa tripsina (Promega) hasta un volumen final de $38\ \mu\text{L}$ ($800\ \text{ng}$) dejando la reacción transcurrir durante toda la noche a 37°C y, tras esto, se detuvo con $4\ \mu\text{L}$ de ácido trifluoroacético (Fisher Scientific; 10% concentración final). Con todo ello, se obtuvo una concentración peptídica final de $0,9\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.4 Ensayo LC-MS/MS

El análisis de las muestras de proteínas ya procesadas se realizó en la instalación de proteómica SCSIE de la Universidad de Valencia, en un sistema de cromatografías líquidas de alta resolución Dionex Ultimate 3.000 RSLC Nano System acoplado a un espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). Para cada muestra, se cargaron primeramente $2\ \mu\text{L}$ en una columna de lavado (nano LC Column, $3\ \mu\text{m}$ particles size C18-CL, $350\ \mu\text{m}$ diameter x $0.5\ \text{mm}$ long; Eksigent Technologies) con la que se logra tanto pre concentrar el analito como eliminar las sales y otras impurezas que interferirían en el análisis mediante un flujo de $3\ \mu\text{L}/\text{min}$ de $0,1\%$ FA durante 5 minutos. Posteriormente se cargaron los péptidos ya purificados en una columna analítica de fase reversa (LC Column, $3\ \mu\text{m}$ particles size C18-CL, $75\ \mu\text{m}$ diameter x $12\ \text{cm}$ long, Nikkyo) equilibrada anteriormente con acetonitrilo (ACN) 5% y ácido fórmico (FA) $0,1\%$, la cual permite la separación de los péptidos tras 120 minutos con un flujo de $300\ \text{nL}/\text{min}$ de la fase móvil en un gradiente lineal. Esta inicia con un 5% de la fase B (80% ACN $0,1\%$ FA) y 95% de fase A ($0,1\%$ FA) y alcanza el 30% B y 70% A a los 80 minutos, el 45% y 55% a los 91 minutos y el 100% de B a los 93, manteniéndose 5 minutos para eluir todos los péptidos restantes en la columna al haber disminuido la polaridad de la fase móvil gradualmente hasta este punto. Para finalizar, se vuelve a un 5% de la fase B durante 20 minutos. Con todo este proceso, se logra que la muestra llegue fraccionada al espectrómetro nanoESI qTOF, facilitando la detección de los péptidos al disminuir la complejidad de esta.

A continuación, se inyecta la muestra en el espectrómetro nanoESI qTOF mediante una fuente iónica DuoSpray™ que permite elegir entre ionización por nano electro spray (nano ESI) y ionización química a presión atmosférica (APCI). Al final del ensayo se obtienen unos archivos que

se deberán analizar bioinformáticamente para extraer la información sobre las proteínas identificadas y su cuantificación relativa (indicada por su intensidad). Para minimizar el efecto de la variación instrumental sobre la variación entre los grupos experimentales V y C, las muestras se analizaron aleatoriamente.

3.5 Procesado bioinformático de los archivos

3.5.1 ProteinPilot

Una vez generados los archivos a partir de los espectros peptídicos, es necesario analizar estos datos para anotar cualitativa y cuantitativamente las proteínas presentes en las muestras. Para esta labor existen diversas herramientas como Mascot, MaxQuant o Protein Pilot, la escogida en este estudio. El programa ProteinPilot v5.0 (ABSCIEX) emplea los algoritmos Paragon™ Algorithm y Pro Group™ Algorithm con los que se logra la identificación y cuantificación de las proteínas a partir de los espectros generados anteriormente. El primero, se encargó de comparar las secuencias peptídicas de los espectros MS/MS con las de la base de datos Swiss-Prot (secuencias anotadas y revisadas manualmente) (07/01/2017) para identificar las proteínas, con los siguientes parámetros: digestión con tripsina, alquilación en las cisteínas, y sin restricción taxonómica, por lo que pueden identificarse las proteínas en otras especies que no sean conejo. El segundo, por otra parte, permite la cuantificación relativa de las proteínas de forma precisa al evitar que se cuenten péptidos de manera repetida sobreestimando algunas proteínas, esto es, genera grupos de proteínas según los péptidos compartidos, los cuales se evita tener en cuenta centrándose el conteo en los péptidos específicos de cada proteína. Sólo se validaron las proteínas y los péptidos que tuvieron una confianza mayor al 95%, así como sólo se aceptó la identificación de una proteína dada cuando contenía al menos dos péptidos identificados.

En concreto, para la cuantificación relativa sin marcaje (label-free), ésta se realiza a partir de los archivos generados por el HPLC-MS/MS, de los cuales se extraen las áreas de los picos de los iones peptídicos. La variación en la cantidad de cada proteína se calcula con el ratio de las áreas de los péptidos que las identifican. De nuevo, sólo se cuantificaron aquellas proteínas con más de 2 péptidos con un nivel de confianza mayor o igual 95%. Los datos proteómicos, así como los archivos resultantes de los análisis, fueron depositados en el consorcio ProteomeXchange a través del repositorio de uno de sus miembros, PRIDE.

3.5.2 Análisis bioestadístico

Una vez identificadas y cuantificadas las proteínas presentes en cada una de las 8 muestras se llevaron a cabo una serie de análisis estadísticos que permitieron filtrar el pull inicial de proteínas y distinguir aquellas con una expresión diferencial entre las poblaciones control y vitrificada. Las herramientas a las que se recurrió fueron el programa InfernoRDN

(www.omics.pnl.gov, Pacific Northwest National Laboratory, versión 1.1.6109), el cual permite un manejo más sencillo del paquete estadístico R (versión 3.3.1) al dotarnos de una interfaz gráfica más intuitiva, y el programa Microsoft Excel del paquete Office para Windows (versión 15.32 (170309), Windows®).

3.5.2.1 Análisis de la varianza (ANOVA)

El primer paso en el análisis estadístico consistió en realizar un test de la varianza entre las intensidades de las proteínas obtenidas a partir de los archivos generados por espectrometría de masas, distinguiendo cuales estaban diferencialmente expresadas entre las poblaciones estudiadas. Para ello se recurrió al programa InfernoRDN, definiendo primeramente los factores experimentales considerados en el análisis proteómico (control o vitrificado) y asociando cada uno con las 8 muestras totales según correspondiera (vitrificado: V-1, V-2, V-3, V-4; control: C-1, C-2, C-3 y C-4). Se considerará expresión diferencial estadísticamente significativa en aquellas proteínas con un p-valor inferior a 0,05.

3.5.2.2 Análisis de Componentes Principales (PCA) y HeatMap

Una vez realizado el análisis de la varianza, con las proteínas diferenciales resultantes se realizó un análisis de componentes principales (PCA), así como un HeatMap haciendo uso nuevamente de InfernoRDN. Para el PCA, se seleccionaron las proteínas de interés y se generó un gráfico de dispersión 2D en el que se organizaron las 8 muestras según la varianza de estas. El PCA es una técnica que permite reducir el número de variables perdiendo la menor cantidad de información posible, siendo las componentes principales una combinación de variables que comparten información redundante. La primera componente principal explicará la mayor parte de la variabilidad entre las muestras.

En el caso del HeatMap, lo que se hace es generar una matriz en la que situamos la intensidad de cada proteína para cada muestra. Para obtener dicha matriz, se han usado algoritmos de agrupamiento jerárquico con el método "Complete Linkage" que permiten establecer grupos/clústers a partir de las distancias euclídeas. De este modo, se obtiene un dendograma en el que primero se relacionan las muestras separadas por distancias mínimas (intensidades de las distintas proteínas más similares), después se relacionan grupos de muestras más cercanos y así sucesivamente. Otro dendograma se genera a partir de las intensidades de expresión de las proteínas, agrupando primeramente aquellas con patrones más similares en las distintas muestras y continuando como en el anterior caso. Los dos dendogramas se representan (muestras en eje vertical y proteínas en el eje horizontal) y se obtiene así el mapa de clústering con los valores de intensidad indicados por colores (azul y rojo).

3.5.2.3 Fold change (FC) y t-Test

Tras determinar qué proteínas se encontraban diferencialmente expresadas, se procedió a evaluar cómo de grande era la diferencia entre los grupos V y C. Para este punto se recurrió al programa Microsoft Excell. Primeramente, se calcularon las intensidades medias de cada proteína en cada grupo para medir posteriormente los fold change (FC) promedios e individuales, así como se calculó el estadístico t-Student de dos colas, con las intensidades para cada proteína en las muestras de un grupo y otro, mediante la función “PRUEBA.T”.

Una serie de reglas fueron establecidas para considerar si debían permanecer en el análisis cada una de las proteínas según su expresión diferencial era suficientemente consistente. Primeramente, se mantuvieron aquellas proteínas con un fold change entre grupos (promedio) superior o mayor que 1 o, por el contrario, menor o igual que -0,5 (100% expresión diferencial). En caso de estar cierta proteína fuera de este rango, se comprobó su t-Student y, si era menor a 0,05; se amplió el rango a mayor que 0,2 o menor que -0,17 (20% expresión diferencial) (Sharma et al. 2014; Su et al. 2016). En segundo lugar, se consideraron en el análisis aquellas proteínas, de entre las que pasaban la anterior regla, que presentaban un fold change individual para todas las muestras (o todas menos 1) con valores consistentes, esto es, al menos 3 muestras en el grupo control con un FC positivo y 3 en el vitrificado con un valor negativo, o viceversa.

El fold change promedio o entre grupos para cada proteína, se define como la intensidad media en las 4 muestras de un grupo entre la media de las 4 muestras del otro grupo, menos 1; según esto, un valor de 1 indicaría que la proteína se expresa el doble (100% más) en el grupo A que en el B, y -0,5 implicaría el doble de expresión en B:

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

El fold change individual se definió como la intensidad, para cada proteína, de una de sus muestras en un grupo entre la media de las intensidades del otro grupo, obteniéndose pues, 8 FC individuales por proteína:

$$FC \text{ individual} = \frac{\text{Muestra grupo A}}{\text{Media grupo B}} - 1 \quad (2)$$

3.5.3 Análisis funcional

3.5.3.1 BLAST

Llegados a este punto, el siguiente paso en el análisis proteómico consistió en obtener los identificadores de conejo para las proteínas que habían pasado los anteriores filtros. Debido a que en el paso de identificación de proteínas mediante ProteinPilot no se delimitó la búsqueda al taxón

Oryctolagus cuniculus, muchos de los resultados obtenidos de la base de datos SwissProt no se correspondían con esta especie. Por ello, se realizó un BLASTN (<https://www.uniprot.org/blast/>) en la base de datos UniprotKB (25/01/2018) para las proteínas identificadas en otra especie y se anotó el nuevo identificador para la proteína ortóloga en *O. cuniculus* con mayor score (mayor homología de secuencias).

3.5.3.2 Clasificación y Enriquecimiento funcional

Para tener una visión global del papel de las proteínas implicadas en el análisis proteómico llegados a este paso, se recurrió a los términos GO, puesto que resultaría complicado estudiar cada proteína individualmente en un análisis de estas proporciones. Con tal fin, se hizo uso de la herramienta de mapeo de Uniprot, proporcionando los identificadores y obteniendo así unas gráficas de fácil comprensión y visualización. Obtenidos los términos GO implicados y su proporción se realizó un paso de enriquecimiento funcional, con el que ver los términos verdaderamente enriquecidos en el análisis, independientemente de la presencia elevada de ciertas proteínas por naturaleza del tejido de procedencia. Este punto se llevó a cabo mediante la herramienta on-line DAVID (www.david.ncifcrf.gov, versión 6.8) proporcionándole los identificadores de nuestras proteínas y marcando la opción “Uniprot accession”. Entre la información resultante tendremos los términos GO enriquecidos, así como las rutas metabólicas enriquecidas con un p-valor inferior a 0,05.

3.5.3.3 KEGG Mapper e Interacciones proteicas

Un método de visualizar de forma rápida y sencilla las rutas metabólicas de relevancia en el análisis es mediante la herramienta KEGG Mapper. En primer lugar, se volverá a usar la herramienta de mapeo de Uniprot y obtendremos los ID-KEGG de nuestras proteínas a partir de sus ID-Uniprot. Estos nuevos identificadores serán los que se introducirán en el KEGG Mapper y de todas las rutas metabólicas resultantes se comprobarán sólo las indicadas como enriquecidas con anterioridad por DAVID.

Un último punto que comprobar son las posibles interacciones entre las proteínas que han pasado el filtrado hasta este momento. Para ello se utilizó el programa STRING, que considera una serie de evidencias que permiten establecer las interacciones proteicas a partir de los identificadores de Uniprot que le proporcionemos.

4. Resultados

4.1 Procesado bioinformático de los datos

4.1.1 Análisis bioestadístico

Tras el análisis por espectrometría de masas de los péptidos presentes en muestras de hígado de conejo en los grupos de la segunda generación filial procedentes de poblaciones vitrificadas (V) y no vitrificadas (C), se identificaron un total de 1492 proteínas. Estos datos fueron proporcionados por el servicio de proteómica de la Universitat de València. A continuación, se procedió al análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre los dos grupos experimentales mediante el programa InfernoRDN. Para ello, se realizó un análisis estadístico de la varianza “ANOVA” con los valores de intensidad de todas las proteínas presentes, descartando aquellas que no rechazaban la hipótesis nula (p-valor superior a 0,05). Los resultados obtenidos fueron 67 proteínas significativas que se seleccionaron para posteriores análisis. Mediante el programa Microsoft Excell, se calcularon los promedios de intensidad de cada proteína para ambos grupos experimentales, así como los “fold change” tanto entre grupos, cómo entre muestra y grupo. Los valores obtenidos sirvieron para realizar un segundo filtrado de las proteínas, superándolo aquellas diferencialmente expresadas con mayor fuerza, esto es, al menos 1,2 (fold change superior a 0,2 o inferior a -0,17) veces más expresada en un grupo o muestra respecto al otro grupo. Cabe destacar que, como se indica en la **tabla 1**, en 46 de las 65 proteínas finales que superaron este paso, la diferencia de expresión resultó ser del doble o incluso más (fold change superior a 1 o inferior a -0,5).

Tabla 1. Cantidad de proteínas diferencialmente expresadas en F vs V que aumentan o disminuyen la expresión x2 o más (Fold change superior o igual a 1, o inferior o igual a -0,5) y de proteínas que aumentan o disminuyen la expresión x1,2 o más (Fold change entre 0,2 y 1 o entre -0,17 y -0,5). Porcentajes obtenidos respecto las 65 proteínas totales.

	NÚMERO DE PROTEÍNAS
Proteínas diferencialmente expresadas con FC mayor que 1 o menor que -0,5	46 (70,8%)
Proteínas diferencialmente expresadas con FC entre 0,2 y 1 o entre -0,17 y -0,5	19 (29,2%)

4.1.2 HeatMap y Análisis de Componentes Principales (PCA)

Mediante InfernoRDN se obtuvieron también los gráficos del mapa de calor (HeatMap, **Figura 5**) y del análisis de componentes principales (PCA, **Figura 6**) de todas las proteínas diferencialmente expresadas (67), que permiten visualizar de forma clara y sencilla las diferencias

en la expresión proteica entre el grupo fresco y el vitrificado para aquellas proteínas diferencialmente expresadas.

En el caso del HeatMap, los dos clusters representados por los colores rojo y cian permiten distinguir cómo las muestras C1, C2, C3 y C4 presentan comportamientos de expresión similares, pudiéndolos agrupar a todos en F. De igual modo ocurre con las muestras V1, V2, V3 y V4; con patrones comunes que permiten englobarlos en el grupo V. Por otro lado, se hace patente que los grupos F y V tienen un comportamiento opuesto. Esto es, vemos que cuando una proteína tiene una expresión muy elevada en uno de los grupos, en el otro la expresión es menor y viceversa.

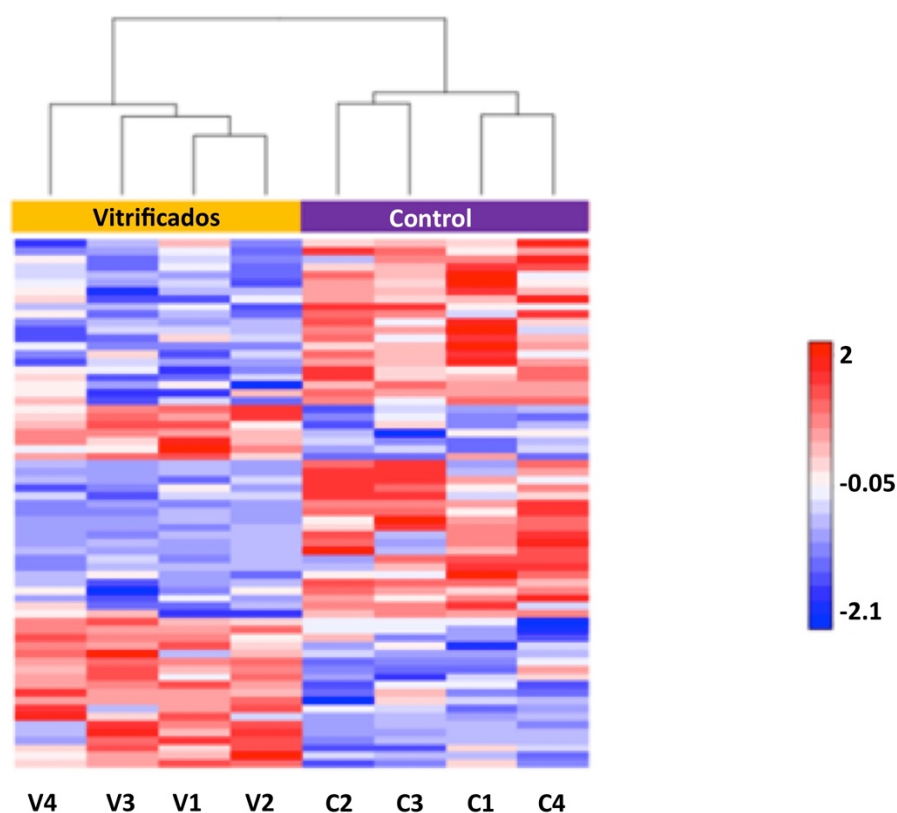


Figura 5. Heatmap obtenido del clustering de las muestras hepáticas de conejo de la comparación Fresco (C) vs Vitrificado (V) en base a las proteínas diferencialmente expresadas. Se observan dos grupos, con las muestras de poblaciones vitrificadas agrupadas a la izquierda (C4, C3, C1, C2; amarillo) y las de poblaciones no vitrificadas a la derecha (V2, V3, V1, V4; morado).

En segundo lugar, cuanto al análisis de componentes principales empleado, se trata de un PCA bidimensional que considera el 73,5 % de la variabilidad entre grupos. Éste nos separa claramente las muestras procedentes de ambas poblaciones a partir de la componente principal PC1, que alcanza a explicar un 64,2 % de la variabilidad entre estos dos grupos. La segunda

componente principal PC2, no parece separar las muestras en base a alguna característica de relevancia.

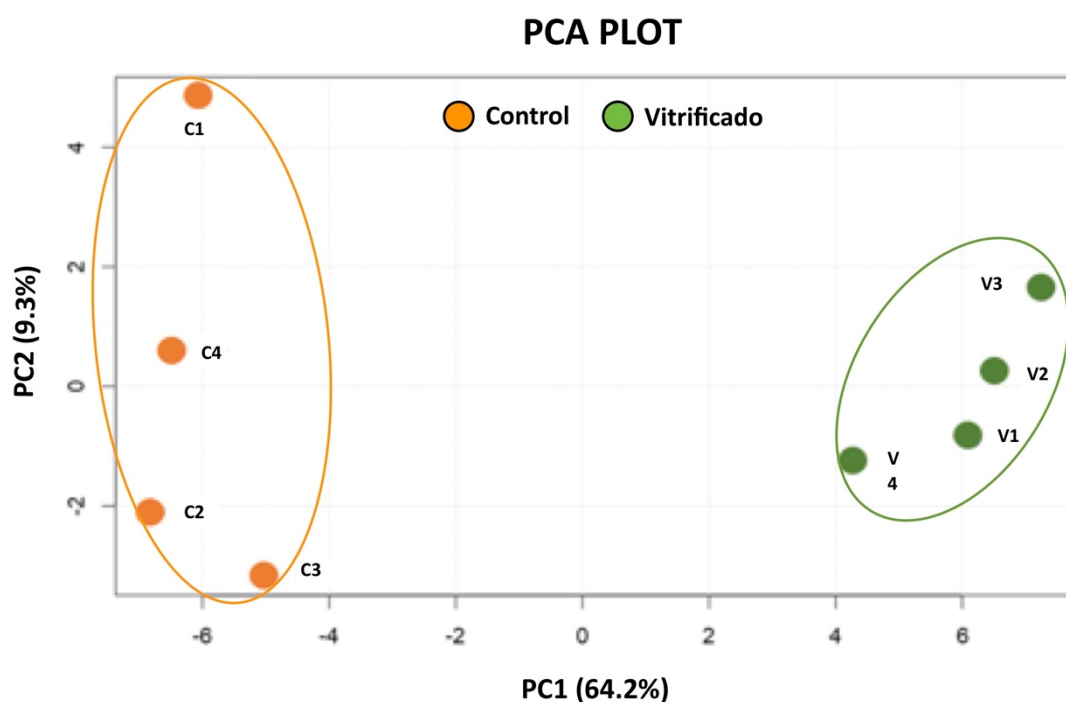


Figura 6. Gráfico de dispersión obtenido a partir del Análisis de Componentes Principales (ACP) de las proteínas diferencialmente expresadas en muestras hepáticas de conejo en la comparación Fresco vs Vitrificado. La primera componente principal (CP1; 64,2%) separa las muestras de la población F y V. La segunda componente principal (CP2; 9,29%) explica la variabilidad en la agrupación de las muestras, con mayor diversidad entre las muestras del grupo F y con patrones de expresión proteica más comunes entre las muestras del grupo V. En total, el ACP explica un 73,5% de la variabilidad.

4.1.3 BLAST

Llegados a este punto, se realizó un BLASTN debido a que la especie de origen de algunas proteínas no se correspondía con *Oryctolagus cuniculus*, puesto que, al identificarlas, el servicio bioinformático de la Universidad de Valencia las enfrentó con una base de datos general de mamíferos.

Así pues, se hizo uso de la herramienta BLAST de Uniprot con los identificadores de dichas proteínas. De las 65 proteínas filtradas hasta el momento, 26 tenían asignada otra especie de procedencia, pero, tras el BLAST, se encontraron ortólogos en *Oryctolagus cuniculus* para 24 de estas, no pudiéndose obtener para D7NYF7 (NADH dehidrogenase 1 beta subcomplex 10 (Fragment)) y F6PQ71 (Uncharacterized protein). De cada run se seleccionó el hit de mayor score al aportar un mejor alineamiento de secuencias, y se anotó el nuevo ID y descripción funcional. Con todo ello, resultaron 63 proteínas aptas para los siguientes análisis. En la **tabla 2** se recogen el número de proteínas restantes y porcentajes de proteínas que superan cada fase, tras cada paso de selección a lo largo del procesado de los datos.

Tabla 2. De izquierda a derecha: número de proteínas restantes tras cada paso de selección, porcentaje de proteínas que han pasado respecto el total inicial y porcentaje de proteínas que logran superar cada paso respecto el anterior.

*Se consideraron diferencialmente expresadas aquellas proteínas con un p-value < 0,05.
**Se consideró como fold change (FC) significativo aquel mayor que 0,2 o menor que -0,17 entre grupos; con t-student < 0,05.

	NÚMERO DE PROTEÍNAS	PROTEÍNAS TOTALES (%)	PROTEÍNAS RELATIVAS (%)
Proteínas identificadas tras análisis por espectrometría de masas	1492	100%	4,5%
Proteínas diferencialmente expresadas tras realizar un ANOVA*	67	4,5%	97%
Proteínas diferencialmente expresadas con Fold Change significativo**	65	4,4%	96,9%
Proteínas diferencialmente expresadas y con FC significativo tras realizar BLAST	63	4,2%	

4.2 Análisis funcional

4.2.1 Clasificación funcional

En una primera aproximación para clasificar las proteínas en base a sus funciones, se emplearon las ontologías génicas (términos GO). Para ello, se recurrió a la web Uniprot, aportando los IDs de las proteínas seleccionadas hasta el momento. Se obtuvo que 53 de ellas estaban

implicadas en funciones moleculares, y dentro de esta categoría, la mayoría estaban implicadas en uniones (35) o actividad catalítica (39); 46 pertenecían a componentes celulares, principalmente dentro de la parte celular (35); y 41 englobadas en procesos biológicos, destacando los procesos metabólicos (28) y celulares (28) así como regulación biológica (18). En la **figura 7** se pueden observar la proporción que representan las proteínas de cada ontología génica sobre el total de las 63 proteínas diferencialmente expresadas finales.

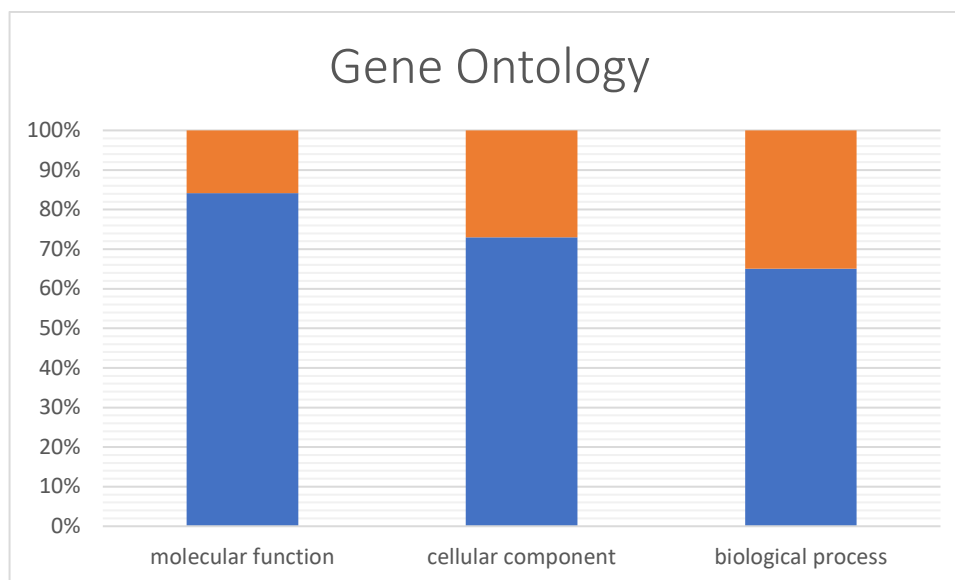


Figura 7. Diagrama de columnas indicando los porcentajes de las proteínas implicadas (azul) en cada una de las tres ontologías génicas respecto las 63 proteínas diferencialmente expresadas totales.

4.2.2 Enriquecimiento funcional

Una vez comprobados los términos GO en los que estaban implicadas las proteínas, se procedió realizando un enriquecimiento funcional de aquellos términos verdaderamente predominantes; esto es, aquellos que aparecían en un mayor número de proteínas, evitando sobreestimar los términos más habituales en una muestra por simple azar, en que, de manera natural, la mayor parte de proteínas cumple cierta función independientemente del efecto experimental a estudiar.

Para ello, se recurrió al programa bioinformático online DAVID. Se proporcionaron los 63 identificadores proteicos, de los cuales 54 fueron identificados en la base de datos del programa, y se obtuvo una lista de los términos GO enriquecidos, seleccionando aquellos con un p-valor inferior a 0,05, resultando un total de 15 (**Anexo 3**). De entre los términos seleccionados, destaca en sobremedida el de componente celular de exosomas, con un 46,3 % de las proteínas totales implicadas en él.

4.2.3 Rutas KEGG

Otra forma de visualizar con mayor facilidad y detalle los procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas diferencialmente expresadas es mediante las rutas KEGG. Primero se listaron los ID-KEGG para las proteínas diferenciales partiendo de los ID-UniprotKB. No obstante, no todas las proteínas tenían ID para KEGG, listándose 32 de las 63 iniciales, y obteniéndose en total 33 ID-KEGG (G1TR9H mapeó con dos). Estos IDs serían utilizados después con la herramienta KEGG MAPPER.

De entre todas las rutas en las que estaban implicadas las proteínas, se seleccionaron sólo aquellas que habían sido indicadas como enriquecidas mediante el programa DAVID, obteniéndose 16 rutas estadísticamente significativas (p-valor inferior a 0,5; **Anexo 2**). Por otro lado, la ruta KEGG de rutas metabólicas resultó ser la más enriquecida, con un 40.7 %, de las proteínas implicadas. Dentro de esta ruta destacaban, con buena parte de las 22 proteínas implicadas, el metabolismo lipídico y la biosíntesis y metabolismo de glicanos,

4.2.4 Interacciones proteicas

Finalmente, se estudió si existían interacciones entre las proteínas que participaban en cada una de las rutas KEGG enriquecidas por DAVID. Para este paso será necesario emplear la herramienta online STRING, a la que proporcionamos los identificadores de UniprotKB de las proteínas implicadas en dichas rutas.

De entre todas las proteínas implicadas, 3 resultaron presentar interacciones (G1TAH7, G1T8G9, P79226), cada una con las otras dos, en rutas metabólicas, metabolismo del carbono, biosíntesis de aminoácidos y biosíntesis de antibióticos; mientras que, por otro lado, 2 proteínas (G1TBU9, G1TES6) presentaron interacciones en biosíntesis de antibióticos y degradación de valina, leucina e isoleucina. Las proteínas implicadas se encontraron todas sobre expresadas en el control (C).

5. Discusión

Tal y como se ha descrito a lo largo de la introducción, son varios los estudios que han demostrado la existencia de cambios tanto en el fenotipo como en los patrones de expresión de embriones sometidos a procedimientos de crioconservación (Mamo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Saenz-de-Juano *et al.*, 2012; al-Hasani *et al.*, 1992; Saenz-de-Juano *et al.*, 2014). Estos efectos han sido observados tanto a nacimiento, como en individuos adultos (Pinborg *et al.*, 2014; Redondo, 2014; Lavara *et al.*, 2015). Además, destacar que son varios los trabajos que han demostrado que estos efectos son también transmisibles a su descendencia (Lavara *et al.*, 2014; Borrás, 2017). No obstante, hasta la fecha no se ha demostrado si estos cambios son heredables (transgeneracionales) debido al efecto directo de la crioconservación sobre la línea germinal embrionaria (Martos *et al.*, 2015). Como resultado principal de este estudio podemos afirmar la existencia de un efecto transgeneracional de la crioconservación en base a la expresión proteica diferencial observada entre los individuos adultos derivados de una población vitrificada (V) y control (C).

El análisis proteómico diferencial del tejido ha revelado un total de 67 proteínas diferencialmente expresadas entre ambas poblaciones, de un total de las 1492 proteínas identificadas en el análisis LC-MS/MS inicial (4,5% del total). Destacar que tanto el análisis *HeatMap* como el análisis de componentes principales muestra con claridad la existencia de 2 poblaciones claramente diferenciadas. Además, el análisis de componentes principales muestra que la población vitrificada presenta una menor variabilidad que la control (menor dispersión de muestras). Quizás, esto podría ser explicado como una consecuencia de la crioconservación que implicaría una supervivencia de aquellos embriones que logran adaptarse al estrés, por lo que aquellos animales “supervivientes” son más similares entre sí.

Analizando los resultados desde un punto de vista general, a partir de los términos GO y rutas metabólicas enriquecidas proporcionados por DAVID, se aprecia que de entre los distintos procesos biológicos, los procesos metabólicos presentan el menor p-valor (5,3E-03) por lo que resultan los más afectados por la crioconservación. A este grupo pertenecen proteínas como la UDP-glucuronosyltransferase 2A3 o la UDP-glucuronosyltransferase 2B31, pertenecientes al grupo de las UDP-glucosiltransferasa (UGT). Esta actividad está asociada con la eliminación de compuestos exógenos potencialmente tóxicos (Bock, 2016.), como podrían ser los crioprotectores empleados para garantizar la supervivencia del embrión a las bajas temperaturas, considerados xenobióticos. Así pues, y como ya fue descrito por Borrás (2017) en una población de individuos nacidos de animales vitrificados (generación 1), esto podría indicar que en la generación 2 se activan mecanismos de síntesis de UGTs debido a la exposición a elevadas concentraciones de crioprotectores y que prepararían al embrión para un posible ambiente futuro con gran cantidad

de compuestos exógenos. No obstante, aunque UGT2A3 se encuentra sobreexpresada en el tejido hepático de animales derivados de una población vitrificada, no ocurre así con UGT2B31, sobreexpresada en la población control. Esto podría explicarse, por un lado, debido a un error en la identificación MS/MS, obteniendo un identificador que no se corresponde con la proteína verdadera o en su defecto, con un ortólogo adecuado, o por otro lado, a que no tiene actividad específica frente a los crioprotectores empleados, disminuyendo su síntesis en favor de las UGTs que logran eliminarlos. Por otra parte, la proteína sterol carrier protein 2 (SCP2) sobreexpresada en los animales de la población vitrificada, está relacionada con el transporte y almacenaje de lípidos tales como el colesterol, habiéndose visto en otros estudios cómo su sobreexpresión lleva a una mayor expulsión de colesterol a través de los ácidos biliares y disminución de la síntesis de colesterol de novo (Amigo *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2016). Esto podría explicar, en parte, el menor peso del hígado observado en animales nacidos de una población vitrificada (generación 1) (Lavara *et al.* 2015), así como unos niveles de colesterol observados inferiores en comparación al grupo control (Comunicación personal). Por último, y en relación con el metabolismo lipídico, se detectó la proteína acetyl-CoA acyltransferase 2 (ACAA2), que se encuentra infraexpresada en la población derivada de vitrificación. Esta proteína está implicada en la degradación de los ácidos grasos en la mitocondria durante el último paso de la beta oxidación, y en la elongación de nuevos ácidos grasos en las glándulas mamarias (Miltiadou *et al.*, 2017). Por tanto, esta modificación podría afectar la disponibilidad energética y podría tener repercusión en el desarrollo del individuo, cuestión ya descrita con anterioridad en poblaciones vitrificadas y control (Lavara *et al.*, 2015).

Cuanto a los términos GO de compartimento celular, destaca la abundancia de proteínas mitocondriales (16,7% del total) tal y como ya fue descrito por Redondo (2014), proteínas de membrana tanto en el retículo endoplasmático como en el resto de los orgánulos (11,1% y 14,8% respectivamente) y, sobre todo, proteínas presentes en los exosomas (46,3%), pequeñas vesículas extracelulares que pueden contener en su interior proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Colombo *et al.*, 2014).

Avanzando ahora hacia las funciones moleculares, la actividad aromatasa es la que presenta un p-valor más bajo (7,70E-05). Dentro de esta actividad encontramos 4 proteínas (CYP2C30, CYP2C4, CYP2C y CYP2C15) pertenecientes a la subfamilia citocromo P450 2C, caracterizadas por presentar un grupo hemo que les permite catalizar reacciones redox por las que introducen un átomo de oxígeno en el sustrato, siendo conocidas como monooxigenasas (Bak *et al.* 2011). Esta subfamilia, concretamente, está implicada en la eliminación de numerosas drogas, lo cual podría implicar un papel similar al propuesto para las UGTs ya que 3 de 4 se encuentran sobreexpresadas en los animales derivados de una población vitrificada, e intervienen también en el metabolismo lipídico (Depaz *et al.* 2015). Otras funciones moleculares relacionadas con la anterior son la actividad de unión a grupo hemo y la de unión a iones hierro. Estos 3 términos GO

comparten las mismas proteínas excepto por CYP2B4, sobreexpresada también en en los animales derivados de una población vitrificada y sin actividad aromatasa; hecho esperable puesto que todas tienen un grupo hemo con ión hierro para su actividad redox. Otras dos funciones también enriquecidas y relacionadas de nuevo con los citocromos P450 son la actividad monooxigenasa y la actividad oxidorreductasa. Prosiguiendo con más funciones moleculares, la actividad 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa presenta también diferencias, con 2 proteínas implicadas: la hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH) y la hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 10 (HSD17B10). HADH es un enzima clave en el tercer paso de la beta oxidación de los ácidos grasos, de modo que su infraexpresión en los animales derivados de una población vitrificada, al igual que ocurría con la acetyl-CoA acyltransferase 2, podría estar relacionada con alteraciones del desarrollo en el individuo al tener menos energía disponible (Schulz et al. 2011). Respecto a la proteína HSD17B10, se trata de una enzima relacionada con el metabolismo lipídico que cataliza la oxidación de esteroides neuroactivos y ácidos grasos, así como la degradación de la isoleucina (Yang et., al 2007). En conjunto, nuestros datos muestran claramente alteraciones a nivel del metabolismo lipídico y de los procesos de oxidorreducción, destacando una gran cantidad de proteínas de localización mitocondrial. Estos resultados, van en la misma línea de lo ya mostrado tanto en el efecto directo de la vitrificación (G0, Redondo, 2014), cómo en su descendencia (G1, Borrás, 2017), donde se muestra diferencias entre animales vitrificados y control tanto en el metabolismo lipídico, cómo reacciones redox.

Por otra parte, del análisis de las rutas KEGG enriquecidas en las proteínas diferencialmente expresadas destacan un total de 16 rutas. De estas, destacar las rutas metabólicas que representan un 40,7% de las 54 proteínas analizadas por DAVID. Este hecho va en la línea con lo discutido hasta el momento, en que la mayoría de las proteínas mencionadas afectaban al metabolismo, y más concretamente al de lípidos. De igual modo ocurre con las rutas del metabolismo de drogas y xenobióticos por el citocromo P450, la biosíntesis de hormonas esteroideas, el metabolismo del ácido araquidónico, el metabolismo del ácido linoleico o la degradación de valina, leucina e isoleucina. En el caso de la ruta de la carcinogénesis química, resulta interesante que 6 de las 8 proteínas implicadas se encuentran sobreexpresadas en los animales derivados de una población vitrificada. Entre estas proteínas volvemos a encontrar a la familia de los citocromos P450 y de las UGTs, lo cual podría implicar mejor eliminación de agentes externos cancerígenos, con mayor resistencia al desarrollo de cáncer en estos individuos, como observó Aurox et al. (2004) en el caso de cáncer de vejiga urinaria inducido con carcinógenos en ratones crioconservados frente a la población control. En esta misma ruta, se observó también una sobreexpresión de la proteína glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1) en los animales derivados de una población vitrificada. Estos resultados han sido ya descritos con anterioridad por otros autores (Mamo et al., 2006; Saenz-de-Juano et al., 2012). Por último, cabe destacar la proteína transketolase (TKT), con el “fold change” (FC) más elevado de entre todas las

diferencialmente expresadas (FC=13,925) que, atendiendo a la definición del FC, representa una expresión en la población control de casi 15 veces superior a los animales derivados de la población vitrificada. Esta proteína supone un punto de unión entre la glicólisis y la rama no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato, la cual desempeña diversas funciones como la obtención de ribosa-5-fosfato y NADPH, principal agente reductor del organismo. Así pues, se ha observado cómo una disminución en la expresión de TKT está asociada con una menor producción de lípidos. Esto posiblemente sea debido una menor producción de NADPH necesaria para la lipogénesis (Xu *et al.*, 2002).

Analizando todos los resultados de forma conjunta, podemos destacar que en nuestro estudio, hay evidencia de que los efectos de la criopreservación embrionaria representan un ejemplo de una plasticidad fenotípica activa, donde aquellos animales derivados de una población que fue sometida a la crioconservación embrionaria presentan una variación fenotípica irreversible en el tejido hepático (Forsman, 2017). Esta plasticidad fenotípica, se entiende como la capacidad de un genoma de dar lugar a varios fenotipos distintos según los estímulos ambientales. Concretamente, se trata de una plasticidad activa puesto que las diferencias observadas son producidas por un cambio a nivel embrionario, modificando el desarrollo del individuo con el fin de anticiparse a los futuros factores ambientales de los que ya se ha recibido algún estímulo. Resultados en esta línea han demostrado que la vitrificación embrionaria induce cambios en la morfología del individuo, como es el menor tamaño del hígado o la menor velocidad de crecimiento tras la lactancia (Lavara *et al.*, 2015). Este tipo de plasticidad se ha asociado a un descenso en la vulnerabilidad a factores ambientales, capacidad invasiva de un organismo y menor riesgo de extinción, todo ello debido a la adaptación del individuo a ese ambiente (Forsman, 2017). Por otra parte, la plasticidad fenotípica se relaciona estrechamente con los fenómenos de divergencia entre poblaciones e incluso de especiación, debido a que una vez producido ese rápido primer cambio fenotípico, la selección natural desempeña un papel de refinamiento sobre esos factores alterados, pasando genes considerados neutrales en un cierto ambiente, a suponer un papel clave en la supervivencia, promoviéndose aquellas modificaciones con mejores características (Pfennig *et al.* 2010). De forma resumida, la plasticidad fenotípica proporcionaría el material base sobre el que la selección natural actuará, conociéndose como asimilación genética cuando el fenotipo se vuelve constitutivo independientemente de la variación ambiental. Por todo ello, podría resultar interesante llevar a cabo futuros estudios para tratar de seleccionar artificialmente rasgos concretos, como las mejores características reproductivas en conejos procedentes de procesos de crioconservación (Lavara *et al.*, 2014) aprovechando la expresión diferencial causada por la plasticidad, buscando una asimilación genética y obtener así una nueva línea animal.

6. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, la técnica de crioconservación de embriones tempranos y su posterior transferencia para generar descendencia induce efectos transgeneracionales en los patrones de síntesis de proteínas del tejido hepático. Estos cambios parecen generar alteraciones del metabolismo lipídico y de los procesos de detoxificación.

7. Referencias

- ABSTRACTS OF THE 33RD ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY (ESHRE), 2017. . *Human Reproduction* 32, i1–i539.
- AFLATOONIAN, A., MANSOORI-TORSHIZI, M., FARID MOJTAHEDI, M., AFLATOONIAN, B., KHALILI, M.A., AMIR-ARJMAND, M.H., SOLEIMANI, M., AFLATOONIAN, N., OSKOUIAN, H., TABIBNEJAD, N., HUMAIDAN, P., 2018. Fresh versus frozen embryo transfer after gonadotropin-releasing hormone agonist trigger in gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles among high responder women: A randomized, multi-center study. *Int J Reprod Biomed (Yazd)* 16, 9–18.
- AL-HASANI, S., HEPNAR, C., DIEDRICH, K., VAN DER VEN, H., KREBS, D., 1992. Cryopreservation of rabbit zygotes. *Hum. Reprod.* 7 Suppl 1, 81–83.
- ALIZADEH, L., OMANI SAMANI, R., 2014. Using fertile couples as embryo donors: An ethical dilemma. *Iran J Reprod Med* 12, 169–174.
- AMIGO, L., ZANLUNGO, S., MIQUEL, J.F., GLICK, J.M., HYOGO, H., COHEN, D.E., RIGOTTI, A., NERVI, F., 2003. Hepatic overexpression of sterol carrier protein-2 inhibits VLDL production and reciprocally enhances biliary lipid secretion. *J. Lipid Res.* 44, 399–407.
- ANGEL, T.E., ARYAL, U.K., HENGEL, S.M., BAKER, E.S., KELLY, R.T., ROBINSON, E.W., SMITH, R.D., 2012. Mass spectrometry based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chem Soc Rev* 41, 3912–3928.
- AUROUX, M., CERUTTI, I., DUCOT, B., LOEUILLET, A., 2004. Is embryo-cryopreservation really neutral? A new long-term effect of embryo freezing in mice: protection of adults from induced cancer according to strain and sex. *Reprod. Toxicol.* 18, 813–818.
- AZIMIFAR, S.B., NAGARAJ, N., COX, J., MANN, M., 2014. Cell-Type-Resolved Quantitative Proteomics of Murine Liver. *Cell Metabolism* 20, 1076–1087.
- BAHAMONDES, L., MAKUCH, M.Y., 2014. Infertility care and the introduction of new reproductive technologies in poor resource settings. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 87.
- BAK, S., BEISSON, F., BISHOP, G., HAMBERGER, B., HÖFER, R., PAQUETTE, S., WERCK-REICHHART, D., 2011. Cytochromes P450. *Arabidopsis Book* 9.
- BESENFELDER, U., BREM, G., 1993. Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J Reprod Fertil* 99, 53–56.
- BOCK, K.W., 2016. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochem. Pharmacol.* 99, 11–17.
- BORRÁS, S. 2017. Efecto de la crioconservación sobre el proteoma de hígado en conejo (*Oryctolagus cuniculus*) Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología. Valencia, Julio 2017
- CALLE, A., FERNANDEZ-GONZALEZ, R., RAMOS-IBEAS, P., LAGUNA-BARRAZA, R., PEREZ-CEREZALES, S., BERMEJO-ALVAREZ, P., RAMIREZ, M.A., GUTIERREZ-ADAN, A., 2012. Long-term and transgenerational effects of in vitro culture on mouse embryos. *Theriogenology* 77, 785–793.

- CHAVATTE-PALMER, P., ROBLES, M., TARRADE, A., DURANTHON, V., 2016a. Gametes, Embryos, and Their Epigenome: Considerations for Equine Embryo Technologies. *Journal of Equine Veterinary Science* 41, 13–21.
- CHAVATTE-PALMER, P., TARRADE, A., ROUSSEAU-RALLIARD, D., 2016b. Diet before and during Pregnancy and Offspring Health: The Importance of Animal Models and What Can Be Learned from Them. *Int J Environ Res Public Health* 13.
- CHU, T., DUFORT, I., SIRARD, M.-A., 2012. Effect of ovarian stimulation on oocyte gene expression in cattle. *Theriogenology* 77, 1928–1938.
- CLUBB, R., ROWCLIFFE, M., LEE, P., MAR, K.U., MOSS, C., MASON, G.J., 2008. Compromised survivorship in zoo elephants. *Science* 322, 1649.
- COHEN, J., TROUNSON, A., DAWSON, K., JONES, H., HAZEKAMP, J., NYGREN, K.-G., HAMBERGER, L., 2005. The early days of IVF outside the UK. *Hum. Reprod. Update* 11, 439–459.
- COLOMBO, M., RAPOSO, G., THÉRY, C., 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289.
- DAVENPORT, M.J., VOLLENHOVEN, B., TALMOR, A.J., 2017. Gonadotropin-Releasing Hormone-Agonist Triggering and a Freeze-All Approach: The Final Step in Eliminating Ovarian Hyperstimulation Syndrome? *Obstet Gynecol Surv* 72, 296–308.
- DEPAZ, I.M.B., TOSELLI, F., WILCE, P.A., GILLAM, E.M.J., 2015. Differential Expression of Cytochrome P450 Enzymes from the CYP2C Subfamily in the Human Brain. *Drug Metab Dispos* 43, 353–357.
- DOBRINSKY, J.R., 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45, 17–26.
- DULIOUST, E., TOYAMA, K., BUSNEL, M.C., MOUTIER, R., CARLIER, M., MARCHALAND, C., DUCOT, B., ROUBERTOUX, P., AUROUX, M., 1995. Long-term effects of embryo freezing in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 589–593.
- FADDY, M.J., GOSDEN, M.D., GOSDEN, R.G., 2018. A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth. *Reprod. Biomed. Online* 36, 455–458.
- FANG, Y., ZENG, S., FU, X., JIA, B., LI, S., AN, X., CHEN, Y., ZHU, S., 2014. Developmental competence in vitro and in vivo of bovine IVF blastocyst after 15 years of vitrification. *Cryo Letters* 35, 232–238.
- FEUER, S.K., RINAUDO, P.F., 2017. Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of in vitro fertilization (IVF) in the mouse. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 8, 403–410.
- FISCHER, B., CHAVATTE-PALMER, P., VIEBAHN, C., NAVARRETE SANTOS, A., DURANTHON, V., 2012. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* 144, 1–10.
- FLEURY, A., PIRELLO, O., MAUGARD, C., MATHELIN, C., LINCK, C., 2018. Breast cancer and ovarian tissue cryopreservation: review of the literature. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.*
- FOGARTY, N.M., MAXWELL, W.M., EPPLESTON, J., EVANS, G., 2000. The viability of transferred sheep embryos after long-term cryopreservation. *Reprod. Fertil. Dev.* 12, 31–37.

- FOOTE, R.H., CARNEY, E.W., 2000. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. *Reproductive Toxicology* 14, 477–493.
- FORSMAN, A., 2015. Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity* volume 115, 276–284.
- GARRELS, J.I., 2001. Proteome, in: *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 1575–1578.
- GUPTA, A., SINGH, J., ANZAR, M., 2016. Effect of cryopreservation technique and season on the survival of in vitro produced cattle embryos. *Animal Reproduction Science* 164, 162–168.
- HERMES, R., SARAGUSTY, J., GÖRITZ, F., BARTELS, P., POTIER, R., BAKER, B., STREICH, W.J., HILDEBRANDT, T.B., 2013. Freezing African Elephant Semen as a New Population Management Tool. *PLOS ONE* 8, e57616.
- HOUEBINE, L.-M., FAN, J. (Eds.), 2009. *Rabbit biotechnology: rabbit genomics, transgenesis, cloning and models*. Springer, Dordrecht.
- IMBERT, R., MOFFA, F., TSEPELIDIS, S., SIMON, P., DELBAERE, A., DEVREKER, F., DECHENE, J., FERSTER, A., VEYS, I., FASTREZ, M., ENGLERT, Y., DEMEESTERE, I., 2014. Safety and usefulness of cryopreservation of ovarian tissue to preserve fertility: a 12-year retrospective analysis. *Hum. Reprod.* 29, 1931–1940.
- INHORN, M.C., PATRIZIO, P., 2015. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum. Reprod. Update* 21, 411–426.
- ISHIDA, M., MOORE, G.E., 2013. The role of imprinted genes in humans. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 826–840.
- KARPIEVITCH, Y.V., POLPITIYA, A.D., ANDERSON, G.A., SMITH, R.D., DABNEY, A.R., 2010. Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. *The Annals of Applied Statistics* 4, 1797–1823.
- KLEIJKERS, S.H.M., MANTIKOU, E., SLAPPENDEL, E., CONSTEN, D., VAN ECHTEN-ARENDS, J., WETZELS, A.M., VAN WELY, M., SMITS, L.J.M., VAN MONTFOORT, A.P.A., REPPING, S., DUMOULIN, J.C.M., MASTENBROEK, S., 2016. Influence of embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicenter RCT. *Hum. Reprod.* 31, 2219–2230.
- KLEIJKERS, S.H.M., VAN MONTFOORT, A.P.A., SMITS, L.J.M., VIECHTBAUER, W., ROSEBOOM, T.J., NELISSEN, E.C.M., COONEN, E., DERHAAG, J.G., BASTINGS, L., SCHREURS, I.E.L., EVERS, J.L.H., DUMOULIN, J.C.M., 2014. IVF culture medium affects post-natal weight in humans during the first 2 years of life. *Human Reproduction* 29, 661–669.
- KOHDA, T., ISHINO, F., 2012. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368, 20120353–20120353.
- KOVALCHUK, I., 2012. Transgenerational Epigenetic Inheritance in Animals. *Front. Genet.* 3.
- KUSHNIR, V.A., BARAD, D.H., ALBERTINI, D.F., DARMON, S.K., GLEICHER, N., 2017. Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004-2013. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 15, 6.

- LARMAN, M.G., KATZ-JAFFE, M.G., MCCALLIE, B., FILIPOVITS, J.A., GARDNER, D.K., 2011. Analysis of global gene expression following mouse blastocyst cryopreservation. *Hum Reprod* 26, 2672–2680.
- LAVARA, R., BASELGA, M., MARCO-JIMÉNEZ, F., VICENTE, J.S., 2015. Embryo vitrification in rabbits: Consequences for progeny growth. *Theriogenology* 84, 674–680.
- LAVARA, R., BASELGA, M., MARCO-JIMÉNEZ, F., VICENTE, J.S., 2014. Long-term and transgenerational effects of cryopreservation on rabbit embryos. *Theriogenology* 81, 988–992.
- LAVARA, R., BASELGA, M., VICENTE, J.S., 2011. Does storage time in LN2 influence survival and pregnancy outcome of vitrified rabbit embryos? *Theriogenology* 76, 652–657.
- LEIBO, S.P., 2008. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology* 69, 37–47.
- LEON-QUINTO, T., SIMON, M.A., CADENAS, R., JONES, J., MARTINEZ-HERNANDEZ, F.J., MORENO, J.M., VARGAS, A., MARTINEZ, F., SORIA, B., 2009. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Anim. Reprod. Sci.* 112, 347–361.
- LEVRON, J., LEIBOVITZ, O., BRENGAUZ, M., GITMAN, H., YERUSHALMI, G.M., KATORZA, E., GAT, I., ELIZUR, S.E., 2014. Cryopreservation of day 2–3 embryos by vitrification yields better outcome than slow freezing. *Gynecological Endocrinology* 30, 202–204.
- MAHSOUDI, B., LI, A., O'NEILL, C., 2007. Assessment of the long-term and transgenerational consequences of perturbing preimplantation embryo development in mice. *Biol. Reprod.* 77, 889–896.
- MAMO, S., BODO, S., KOBOLAK, J., POLGAR, Z., TOLGYESI, G., DINNYES, A., 2006. Gene expression profiles of vitrified in vivo derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. *Molecular Reproduction and Development* 73, 1380–1392.
- MANDAWALA, A.A., HARVEY, S.C., ROY, T.K., FOWLER, K.E., 2016. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology* 86, 1637–1644.
- MARCO-JIMÉNEZ, F., LAVARA, R., JIMÉNEZ-TRIGOS, E., VICENTE, J.S., 2013. In vivo development of vitrified rabbit embryos: Effects of vitrification device, recipient genotype, and asynchrony. *Theriogenology* 79, 1124–1129.
- MARCO-JIMÉNEZ, F., JIMÉNEZ-TRIGOS, E., ALMELA-MIRALLES, V., VICENTE, J.S., 2016. Development of Cheaper Embryo Vitrification Device Using the Minimum Volume Method. *PLOS ONE* 11, e0148661.
- MARTOS, S.N., TANG, W.-Y., WANG, Z., 2015. Elusive inheritance: Transgenerational effects and epigenetic inheritance in human environmental disease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 118, 44–54.
- MAZUR, P., 2018. Stopping Biological Time. *Annals of the New York Academy of Sciences* 541, 514–531.
- 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.

- MCEVOY, T.G., SINCLAIR, K.D., YOUNG, L.E., WILMUT, I., ROBINSON, J.J., 2000. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture *in vitro*: Relevance to blastocyst culture in human ART. *Human Fertility* 3, 238–246.
- MCRAE, L., FREEMAN, R., MARCONI, V., Canadian Electronic Library (Firm), 2016. Living Planet Report 2016: Risk and Resilience in a New Era.
- MILTIADOU, D., HAGER-THEODORIDES, A.L., SYMEOU, S., CONSTANTINO, C., PSIFIDI, A., BANOS, G., TZAMALOUKAS, O., 2017. Variants in the 3' untranslated region of the ovine acetyl-coenzyme A acyltransferase 2 gene are associated with dairy traits and exhibit differential allelic expression. *J. Dairy Sci.* 100, 6285–6297.
- MOSELEY, M.A., 2013. Quantitative Proteomics in Genomic Medicine, in: *Genomic and Personalized Medicine*. Elsevier, pp. 155–165.
- NAKAO, K., INOUE, K., 2010. Cryopreservation for Broader Production of Transgenic Mice by DNA Injection into Zygotes. *Experimental Animals* 59, 225–229.
- NELISSEN, E.C., VAN MONTFOORT, A.P., COONEN, E., DERHAAG, J.G., GERAEDTS, J.P., SMITS, L.J., LAND, J.A., EVERS, J.L., DUMOULIN, J.C., 2012. Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Hum. Reprod.* 27, 1966–1976.
- NEWTON, H., 1998. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. *Human Reproduction Update* 4, 237–247.
- NØRREGAARD JENSEN, O., 2004. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 33–41.
- PFENNIG, D.W., WUND, M.A., SNELL-ROOD, E.C., CRUICKSHANK, T., SCHLICHTING, C.D., MOCZEK, A.P., 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 25, 459–467.
- PINBORG, A., HENNINGSEN, A.A., LOFT, A., MALCHAU, S.S., FORMAN, J., ANDERSEN, A.N., 2014. Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Human Reproduction* 29, 618–627.
- POLGE, C., SMITH, A.U., PARKES, A.S., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.
- PRENTICE, J.R., ANZAR, M., 2011. Cryopreservation of Mammalian Oocyte for Conservation of Animal Genetics [WWW Document]. *Veterinary Medicine International*.
- PUSCHEL, B., DANIEL, N., BITZER, E., BLUM, M., RENARD, J.-P., VIEBAHN, C., 2010. The Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): A Model for Mammalian Reproduction and Early Embryology. *Cold Spring Harbor Protocols* 2010, pdb.emo139-pdb.emo139.
- RABILLOUD, T., 2014. Paleoproteomics explained to youngsters: how did the wedding of two-dimensional electrophoresis and protein sequencing spark proteomics on: Let there be light. *Journal of Proteomics* 107, 5–12.
- RAGAB, M., SÁNCHEZ, J.P., BASELGA, M., 2015. Effective population size and inbreeding depression on litter size in rabbits. A case study. *J. Anim. Breed. Genet.* 132, 68–73

- RALL, W.F., FAHY, G.M., 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 313, 573–575.
- REDONDO, S. 2014. Efecto de La Vitrificación Embrionaria Sobre El Proteoma de Hígados de Conejo. Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología. Valencia, Julio 2014.
- REPORT FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL AND THE EUROPEAN PARLIAMENT Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52013DC0859> (accessed 6.5.18).
- REXHAJ, E., PAOLONI-GIACOBINO, A., RIMOLDI, S.F., FUSTER, D.G., ANDEREGG, M., SOMM, E., BOUILLET, E., ALLEMANN, Y., SARTORI, C., SCHERRER, U., 2013. Mice generated by in vitro fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span. *J Clin Invest* 123, 5052–5060.
- REZAZADEH VALOJERDI, M., EFTEKHARI-YAZDI, P., KARIMIAN, L., HASSANI, F., MOVAGHAR, B., 2009. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 26, 347–354.
- RIGGS, R., MAYER, J., DOWLING-LACEY, D., CHI, T.-F., JONES, E., OEHNINGER, S., 2010. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. *Fertil. Steril.* 93, 109–115.
- RINAUDO, P.F., GIRITHARAN, G., TALBI, S., DOBSON, A.T., SCHULTZ, R.M., 2006. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.* 86, 1252–1265.e1–36.
- SAENZ-DE-JUANO, M.D., MARCO-JIMÉNEZ, F., PEÑARANDA, D.S., JOLY, T., VICENTE, J.S., 2012. Effects of slow freezing procedure on late blastocyst gene expression and survival rate in rabbit. *Biol. Reprod.* 87, 91.
- SAENZ-DE-JUANO, M. D., MARCO-JIMENEZ, F., SCHMALTZ-PANNEAU, B., JIMENEZ-TRIGOS, E., VIUDES-DE-CASTRO, M. P., PEÑARANDA, D. S., ... VICENTE, J. S. (2014). Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. *Reproduction (Cambridge, England)*, 147(6), 789-801.
- SAENZ-DE-JUANO, M. D., MARCO-JIMÉNEZ, F., & VICENTE, J. S. (2016). Embryo transfer manipulation cause gene expression variation in blastocysts that disrupt implantation and offspring rates at birth in rabbit. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 207, 50-55.
- SANCHEZ-OSORIO, J., CUELLO, C., GIL, M.A., PARRILLA, I., ALMIÑANA, C., CABALLERO, I., ROCA, J., VAZQUEZ, J.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., MARTINEZ, E.A., 2010. In vitro postwarming viability of vitrified porcine embryos: effect of cryostorage length. *Theriogenology* 74, 486–490.
- SANTACREU, M.A., MOCÉ, M.L., CLIMENT, A., BLASCO, A., 2005. Divergent selection for uterine capacity in rabbits. II. Correlated response in litter size and its components estimated with a cryopreserved control population1. *Journal of Animal Science* 83, 2303–2307.
- SARAGUSTY, J., ARAV, A., 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141, 1–19.

- SCHULZ, N., HIMMELBAUER, H., RATH, M., VAN WEEGHEL, M., HOUTEN, S., KULIK, W., SUHRE, K., SCHERNECK, S., VOGEL, H., KLUGE, R., WIEDMER, P., JOOST, H.-G., SCHÜRMAN, A., 2011. Role of medium- and short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in the regulation of body weight and thermogenesis. *Endocrinology* 152, 4641–4651.
- SESSION 23: EUROPEAN AND GLOBAL ART MONITORING (presentation of the EIM and ICMART data reports), 2013. . *Hum Reprod* 28, i38–i39.
- SHARMA, A., WONGKHAM, C., PRASONGWATTANA, V., BOONNATE, P., THANAN, R., REUNGJUI, S., CHA'ON, U., 2014. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to monosodium glutamate. *PLoS ONE* 9, e116233.
- SKINNER, M.K., 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype?: F3 or F2. *Reproductive Toxicology* 25, 2–6.
- STEVENS, J.C., BANKS, G.T., FESTING, M.F.W., FISHER, E.M.C., 2007. Quiet mutations in inbred strains of mice. *Trends Mol Med* 13, 512–519.
- SU, Y., XU, L., WANG, Z., PENG, Q., YANG, Y., CHEN, Y., QUE, Y., 2016. Comparative proteomics reveals that central metabolism changes are associated with resistance against *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. *BMC Genomics* 17, 800.
- TESTART, J., 1998. Episcientific aspects of the epigenetic factors in artificial procreation. *Human Reproduction* 13, 783–785.
- THELEN, J.J., 2007. Introduction to Proteomics: a Brief Historical Perspective on Contemporary Approaches, in: Šamaj, J., Thelen, J.J. (Eds.), *Plant Proteomics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–13.
- THURIN, A., HAUSKEN, J., HILLENSJÖ, T., JABLONOWSKA, B., PINBORG, A., STRANDELL, A., BERGH, C., 2004. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N. Engl. J. Med.* 351, 2392–2402.
- TIITINEN, A., HALTTUNEN, M., HÄRKKI, P., VUORISTO, P., HYDEN-GRANSKOG, C., 2001. Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation. *Hum. Reprod.* 16, 1140–1144.
- TUCKER, M.J., LIEBERMANN, J., 2015. *Vitrification in Assisted Reproduction*, Second Edition. CRC Press.
- VAJTA, G., KUWAYAMA, M., 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65, 236–244.
- VARGHESE, A.C., NAGY, Z.P., AGARWAL, A., 2009. Current trends, biological foundations and future prospects of oocyte and embryo cryopreservation. *Reprod. Biomed. Online* 19, 126–140.
- VENTURA-JUNCÁ, P., IRARRÁZAVAL, I., ROLLE, A.J., GUTIÉRREZ, J.I., MORENO, R.D., SANTOS, M.J., 2015. In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. *Biological Research* 48.
- VICENTE, J.S., VIUDES-DE-CASTRO, M.P., GARCÍA, M.L., 1999. In vivo survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 657–662.
- VROOMAN, L.A., BARTOLOMEI, M.S., 2017. Can assisted reproductive technologies cause adult-onset disease? Evidence from human and mouse. *Reproductive Toxicology* 68, 72–84.

- WANG, Z., XU, L., HE, F., 2010. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. *Fertil. Steril.* 93, 2729–2733.
- WANG, J., BIE, J., GHOSH, S., 2016. Intracellular cholesterol transport proteins enhance hydrolysis of HDL-CEs and facilitate elimination of cholesterol into bile. *J. Lipid Res.* 57, 1712–1719.
- WENNERHOLM, U.-B., HENNINGSEN, A.-K.A., ROMUNDSTAD, L.B., BERGH, C., PINBORG, A., SKJAERVEN, R., FORMAN, J., GISSLER, M., NYGREN, K.G., TIITINEN, A., 2013. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Human Reproduction* 28, 2545–2553.
- WHITTINGHAM, D.G., 1971. Survival of Mouse Embryos after Freezing and Thawing. *Nature* 233, 125–126.
- WILMUT, I., 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sciences* 11, 1071–1079.
- XU, Z.-P., WAWROUSEK, E.F., PIATIGORSKY, J., 2002. Transketolase Haploinsufficiency Reduces Adipose Tissue and Female Fertility in Mice. *Mol Cell Biol* 22, 6142–6147.
- YANG, S.-Y., HE, X.-Y., MILLER, D., 2007. HSD17B10: a gene involved in cognitive function through metabolism of isoleucine and neuroactive steroids. *Mol. Genet. Metab.* 92, 36–42.
- ZHANG, Z., MIAO, L., XIN, X., ZHANG, J., YANG, S., MIAO, M., KONG, X., JIAO, B., 2013. Underexpressed CNDP2 Participates in Gastric Cancer Growth Inhibition through Activating the MAPK Signaling Pathway. *Mol Med* 20, 17–28.

Anexos

Anexo I. Proteínas diferencialmente expresadas

ID	Proteína diferencialmente expresada	P-value	FC	T-Student
G1SER8	profilin 1(PFN1)	0,033	1,234	0,033
G1SF32	translocase of outer mitochondrial membrane 70(TOMM70)	0,028	0,860	0,028
G1SG68	karyopherin subunit alpha 4(KPNA4)	0,036	2,830	0,036
G1SGS7	UFM1 specific ligase 1(UFL1)	0,023	-0,667	0,023
G1SHT2	sterol carrier protein 2(SCP2)	0,034	-0,621	0,034
G1SIN4	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1(ERC1)	0,039	0,476	0,039
G1SN96	paraoxonase 1(PON1)	0,043	1,617	0,043
G1SNC7	dermatopontin(DPT)	0,016	-0,640	0,016
G1SP02	pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit(PDPR)	0,0197	-0,204	0,0197
G1SPD1	myotrophin(MTPN)	0,028	2,368	0,028
G1SQ46	Rho GDP dissociation inhibitor beta(ARHGDI B)	0,043	1,152	0,043
G1SQW0	mitochondrial carrier 2(MTCH2)	0,000	-0,776	0,000
G1SR29	ATPase H+ transporting V1 subunit A(ATP6V1A)	0,043	1,535	0,043
G1SSL9	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13(LOC100348252)	0,027	1,607	0,027
G1SU17	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like(NSDHL)	0,023	-0,378	0,023
G1SVP7	glutathione S-transferase omega 1(GSTO1)	0,005	-0,187	0,005
G1SVZ8	chromosome unknown open reading frame, human C9orf64(LOC100352045)	0,045	-0,507	0,045
G1SXZ9	biphenyl hydrolase like(BPHL)	0,007	1,779	0,007
G1SYC9	RAB8B, member RAS oncogene family(RAB8B)	0,014	-0,568	0,014
G1SZ00	cysteine and glycine rich protein 1(CSRP1)	0,020	-0,605	0,020
G1T0H7	trafficking protein particle complex 3(TRAPPC3)	0,014	-0,711	0,014
G1T2I4	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase(EPRS)	0,024	6,176	0,024
G1T6X2	cytochrome P450 2C15-like(LOC100347004)	0,026	-0,478	0,026
G1T726	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase(HADH)	0,014	0,781	0,014
G1T8G9	pyruvate kinase, liver and RBC(PKLR)	0,001	3,772	0,001
G1T9I4	sorcini(SRI)	0,041	0,484	0,041
G1T9T6	ethanolamine-phosphate phospho-lyase(ETNPPL)	0,034	-0,562	0,034
G1TAH7	transketolase(TKT)	0,020	13,925	0,020
G1TBR1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 2(NQO2)	0,002	-0,376	0,002
G1TBU9	acetyl-CoA acyltransferase 2(ACAA2)	0,037	0,424	0,037
G1TCG5	solute carrier family 27 member 2(SLC27A2)	0,027	3,868	0,027
G1TCT8	major facilitator superfamily domain containing 9(MFSD9)	0,047	-0,447	0,047
G1TES6	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 10(HSD17B10)	0,005	0,323	0,005
G1TIR9	UDP-glucuronosyltransferase 2B31(LOC100341802)	0,049	1,744	0,049
G1TR70	cytochrome P450 2C4(CYP2C4)	0,000	3,777	0,000
G1TRH9	tropomodulin 3(TM0D3)	0,016	1,337	0,016
G1TTZ8	formimidoyltransferase cyclodeaminase(FTCD)	0,010	0,680	0,010

G1TUB8	ribosomal protein L11(RPL11)	0,040	-0,773	0,040
G1TUC2	CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein(CNBP)	0,042	4,497	0,042
G1TUC5	succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit, mitochondrial(LOC100346169)	0,006	4,208	0,006
G1TUX5	protein HP-25 homolog 2(LOC100352752)	0,017	1,009	0,017
G1TWP4	valyl-tRNA synthetase(VARS)	0,001	0,794	0,001
G1TYJ3	dihydropyrimidinase(DPYS)	0,037	0,860	0,037
G1TYM3	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 4(CYP2B4)	0,004	-0,702	0,004
G1U2K8	cytochrome P450-like(CYP2C)	0,009	-0,525	0,009
G1U4I6	fatty acid amide hydrolase(FAAH)	0,003	2,414	0,003
G1U522	protein kinase cAMP-dependent type II regulatory subunit alpha(PRKAR2A)	0,001	6,382	0,001
P04068	epoxide hydrolase 1(EPHX1)	0,044	-0,613	0,044
P79226	aldolase, fructose-bisphosphate B(ALDOB)	0,008	4,266	0,008
Q95J97	protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha(PRKACA)	0,024	-0,700	0,024
U3KLZ1	flavin containing monooxygenase 3(FMO3)	0,043	3,680	0,043
U3KM06	UDP-glucuronosyltransferase 2A3(LOC100351592)	0,003	-0,547	0,003
U3KM31	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)(CNDP2)	0,023	-0,855	0,023
U3KPP4	cytochrome P450 2C30(CYP2C30)	0,027	-0,644	0,027

Anexo II. Rutas KEGG

Ruta KEGG	Descripción	Número de proteínas	Proteínas (%)	P-Value
ocu01100:	Metabolic pathways	22	40,7	6,10E-09
ocu05204:	Chemical carcinogenesis	8	14,8	3,20E-07
ocu00830:	Retinol metabolism	6	11,1	3,30E-05
ocu00140:	Steroid hormone biosynthesis	6	11,1	3,90E-05
ocu01130:	Biosynthesis of antibiotics	8	14,8	5,70E-05
ocu00982:	Drug metabolism - cytochrome P450	4	7,4	5,50E-03
ocu00980:	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	4	7,4	7,60E-03
ocu00590:	Arachidonic acid metabolism	4	7,4	9,30E-03
ocu04750:	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	4	7,4	1,00E-02
ocu00591:	Linoleic acid metabolism	3	5,6	1,20E-02
ocu04726:	Serotonergic synapse	4	7,4	1,30E-02
ocu01200:	Carbon metabolism	4	7,4	1,70E-02
ocu00860:	Porphyryn and chlorophyll metabolism	3	5,6	2,20E-02
ocu00280:	Valine, leucine and isoleucine degradation	3	5,6	2,70E-02
ocu00983:	Drug metabolism - other enzymes	3	5,6	3,50E-02
ocu01230:	Biosynthesis of amino acids	3	5,6	4,40E-02

Anexo III. Términos GO

	Términos GO	Descripción	Número de proteínas	Proteínas (%)	P-Value
Biological Process	GO:0008152	metabolic process	4	7,4	5,3E-03
	GO:0019439	aromatic compound catabolic process	2	3,7	1,0E-02
	GO:0060315	negative regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity	2	3,7	1,7E-02
	GO:0032781	positive regulation of ATPase activity	2	3,7	2,8E-02
Cellular component	GO:0070062	extracellular exosome	25	46,3	5,4E-09
	GO:0031090	organelle membrane	6	11,1	5,8E-07
	GO:0005789	endoplasmic reticulum membrane	8	14,8	6,4E-06
	GO:0005739	mitochondrion	9	16,7	4,4E-03
Molecular function	GO:0070330	aromatase activity	4	7,4	7,7E-05
	GO:0020037	heme binding	5	9,3	1,5E-03
	GO:0005506	iron ion binding	5	9,3	1,9E-03
	GO:0004497	monooxygenase activity	3	5,6	6,5E-03
	GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	3	5,6	8,7E-03
	GO:0003857	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity	2	3,7	2,4E-02
	GO:0016747	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	2	3,7	3,6E-02