

Durant el període preimplantacional, es produïx una àmplia reprogramació epigenètica en l'embrió. No obstant això, este fenomen és sensible a les condicions ambientals. En este context, les tecnologies de reproducció assistida (ARTs) suposen un canvi dràstic en l'entorn natural de l'embrió, ja que estes no aconseguen imitar les condicions maternes òptimes. Per tant, l'aplicació de les ARTs té conseqüències en el posterior desenvolupament de l'organisme. L'objectiu general d'aquesta tesi va ser estudiar els efectes a llarg termini i transgeneracionals de l'estrés provocat per les condicions *in vitro* durant un procediment de vitrificació i transferència d'embrions, utilitzant el conill com a model animal.

En particular, l'objectiu del Capítol I va ser avaluar el potencial del conill com a model per a aquest estudi. En primer lloc, es descriuen en detall dos protocols altament efectius per a transferir i vitrificar embrions de conill. Utilitzant ambdues tècniques, es demostra que la transferència de mòrules, primerenques o compactes, ens permet obtindre taxes de supervivència al naixement superiors al 70% en fresc i al 55% després de la vitrificació. La facilitat amb què es poden realitzar els procediments de criopreservació i transferència d'embrions, l'elevat nombre de descendents que podem obtindre i el curt cicle de vida del conill, van ser claus per a fomentar i facilitar els següents estudis.

El Capítol II va ser dissenyat per a dur a terme un seguiment, a curt i llarg termini, dels efectes produïts per la transferència d'embrions i la tècnica de vitrificació embrionària *per se*, emprant conills neozelandesos. A més, es comparen els efectes de dos dispositius de vitrificació diferents (el cryotop i la ministraw), els quals proporcionen diferents velocitats de refredament i calfament. Els paràmetres que es van estudiar van ser la supervivència prenatal de l'embrió, el creixement de la descendència, el seu fenotip adult, el seu estat de salut, el seu rendiment reproductiu i el seu rendiment en la lactància. Les taxes de supervivència prenatal van ser menors tant per als embrions transferits en fresc (FT), com per als transferits després de la seua vitrificació (VT), en comparació amb aquells concebuts de forma natural (NC). En comparació amb la descendència NC, els animals FT van mostrar una menor taxa de creixement que va conduir a un menor pes corporal en l'edat adulta. Les desviacions post-natals van ser més altes per a la descendència VT i, encara que aquesta va mostrar un major pes al nàixer, la seua taxa de creixement i pes corporal adult va ser menor en comparació amb els animals FT i NC. Aquests resultats van demostrar que cada tècnica aplicada durant la transferència d'embrions vitrificats té un efecte individual *per se*, els quals, a més, són acumulatius. De la mateixa manera, tant la transferència d'embrions com les tècniques de vitrificació van afectar negativament el rendiment de lactació i la composició nutricional de la llet de les femelles adultes. Curiosament, encara que el cryotop va

exercir un efecte positiu sobre la supervivència embrionària, va conduir a majors desviacions fenotípiques post-natals en comparació amb la minisraw. Basant-se en aquests resultats, l'elecció del dispositiu de vitrificació no ha de ser considerada una acció trivial. No obstant això, a pesar d'aquests canvis fenotípics, totes les progènies van ser sanes i fèrtils. Per tant, en aquest primer estudi, queda reflectida la gran plasticitat que ofereix l'embrió dels mamífers en el seu desenvolupament davant dels diferents factors estressants *in vitro*.

Una vegada va quedar demostrat que cada tècnica involucrada en la transferència d'embrions criopreservats té un efecte *per se*, l'objectiu del Capítol III va ser avaluar els efectes del procediment complet de transferència d'embrions vitrificats (VET) en el desenvolupament dels mascles i femelles per separat. Per a això, es van utilitzar conills d'origen californià. Novament, detectem que els animals VT van presentar alteracions tant del pes al nàixer com en el patró de creixement. No obstant això, observem que els mascles es van veure més afectats que les femelles. En l'edat adulta, els mascles van ser sotmesos a una autòpsia *post mortem* i els seus òrgans van ser pesats. Comparats amb els animals NC, els VT van mostrar un pes menor, a més d'una reducció significativa del pes del fetge i el cor. Després d'això, es va realitzar un anàlisi comparatiu del proteoma hepàtic, tractant d'elucidar les marques moleculars subjacents a aquest fenotip. L'anàlisi funcional de les proteïnes diferencialment expressades va demostrar canvis relacionats amb la fosforilació oxidativa, el metabolisme del zinc, i el metabolisme lipídic. Aquests resultats suggereixen que el VET no és un procediment neutral. No obstant això, l'anàlisi sanguini (hematològic i bioquímic) va revelar que l'estat de salut entre els animals VT i NC era comparable.

En el Capítol IV, les cohorts d'animals VT i NC establides en el capítol anterior, es van aparellar durant dos generacions consecutives, dins de cada grup experimental, i sense cap manipulació embrionària. D'esta manera, es va constituir un model de tres generacions (F1, F2 i F3) per a avaluar els efectes transgeneracionals del VET. En cada generació, es va estudiar i comparar el desenvolupament post-natal dels mascles VT i NC. Després del seu aparellament, en cada generació, es va realitzar un estudi per a avaluar la fertilitat dels mascles. Posteriorment estos animals van ser sotmesos a una autòpsia *post mortem* per a examinar el pes dels seus òrgans. Els resultats van mostrar que els efectes directes (F1) del VET van presentar un caràcter intergeneracional (F2) i transgeneracional (F3), ja que les progènies VT van presentar una menor velocitat de creixement i un menor pes corporal adult comparats amb els animals NC coetanis. Les alteracions en el fetge i el cor van ser transmeses a la F2, però només els canvis hepàtics van persistir fins a la F3. Després d'això, es va realitzar un estudi molecular (transcriptòmic y metabòlic) comparatiu del teixit hepàtic entre els animals VT i NC de cada generació. Les dades del RNA-seq van revelar 642 transcrits diferencialment expressats en la F1, dels quals 133 van ser heretats per la F2 i 120 per la F3.

Concordantment, es van detectar 151, 190 i 159 metabòlits diferencialment acumulats en les generacions F1, F2 i F3, respectivament. L'anàlisi funcional de les dades moleculars va demostrar alteracions en el metabolisme del zinc i dels àcids grassos insaturats al llarg de les tres generacions. Estos canvis poden generar alteracions en una xarxa molecular complexa que pot correlacionar-se amb el fenotip mostrat pels animals VT. No obstant això, la fertilitat va ser semblant entre els mascles VT i NC de cada generació, sent este un bon indicador de que el VET no pareix afectar l'estat de salut dels animals VT.

Finalment, al llarg del Capítol V, el nostre propòsit va ser completar el nostre coneixement previ sobre els canvis moleculars transgeneracionals que ocorren després del VET en el teixit hepàtic. Per a això, vam realitzar una aproximació multi-òmica, i es va dur a terme un estudi més profund a nivell metabolòmic y un anàlisi proteòmic per a validar les conseqüències subjacents als canvis moleculars prèviament detectats. A més, es va realitzar una anàlisi de l'epigenoma hepàtic, entés com a possible mecanisme de canalització de l'estrés embrionari fins a l'edat adulta i les generacions posteriors. Tant l'estudi metabolòmic com el proteòmic van validar i ampliar l'estudi molecular del capítol anterior, demostrant alteracions globals en el metabolisme hepàtic dels animals VT, principalment relacionat amb alteracions del metabolisme lipídic (àcids grassos poliinsaturats, esteroides, hormones asteroïdees...). En general, els resultats van indicar que els trastorns metabòlics poden participar en una xarxa complexa de vies fisiològiques que col·lectivament podrien recolzar les diferències observades entre els animals VT i NC. A més, es van detectar grans canvis de metilació en l'epigenoma hepàtic, involucrant gens relacionats amb el metabolisme lipídic i l'apoptosi. D'esta manera, es demostra una herència transgeneracional de les marques moleculars induïdes pel VET en els avantpassats. No obstant això, una vegada més, basant-se en l'estudi sanguini (hematològic i bioquímic) l'estat de salut dels animals VT va ser semblant al dels NC.

Així, els resultats d'esta tesi ens permeten confirmar que l'aplicació d'un VET en els embrions primerencs té conseqüències a llarg termini sobre el fenotip i la fisiologia molecular de la descendència resultant. Durant anys, s'ha cregut que, encara que el VET pot ser letal, este no causava cap efecte en els embrions que sobreviuen al procés, per la qual cosa es considerava una tècnica neutral. Al llarg d'aquesta tesi s'ha demostrat, per primera vegada, que el VET induïx una reprogramació embrionària del desenvolupament que persisteix fins a l'edat adulta i en les generacions posteriors. Es creu que els mecanismes epigenètics medien aquesta plasticitat del desenvolupament i la seua herència transgeneracional, un fet també avalat pels nostres resultats. Per tant, els diferents camps que actualment es nodreixen de la criopreservació i transferència d'embrions, com la medicina i la producció animal, haurien d'avaluar com aquests procediments poden afectar l'eficiència o la consecució dels seus objectius.