

Durante el período preimplantacional, se produce una amplia reprogramación epigenética en el embrión. Sin embargo, este fenómeno es sensible a las condiciones ambientales. En este contexto, las tecnologías de reproducción asistida (ARTs) suponen un cambio drástico en el entorno natural del embrión, ya que éstas no consiguen imitar las condiciones maternas óptimas. De esta manera, la aplicación de las ARTs conlleva consecuencias para el desarrollo posterior del organismo. El objetivo general de esta tesis fue estudiar los efectos a largo plazo y transgeneracionales del estrés provocado por las condiciones *in vitro* durante un procedimiento de vitrificación y transferencia de embriones, utilizando el conejo como modelo animal.

En particular, el objetivo del Capítulo I fue evaluar el potencial del conejo como modelo para este estudio. En primer lugar, se describen en detalle dos protocolos altamente efectivos para transferir y vitrificar embriones de conejo. Utilizando ambas técnicas, se demuestra que la transferencia de mórulas temprana o compactas nos permite obtener tasas de supervivencia al nacimiento superiores al 70% en fresco y al 55% tras la vitrificación. La facilidad con la que se pueden realizar los procedimientos de criopreservación y transferencia de embriones, el elevado número de descendientes que podemos obtener y el corto ciclo de vida del conejo, fueron claves para fomentar y facilitar los siguientes estudios.

El Capítulo II fue diseñado para llevar a cabo un seguimiento, a corto y largo plazo, de los efectos producidos por la transferencia de embriones y la técnica de vitrificación embrionaria *per se*, empleando conejos neozelandeses. Además, se compararon los efectos de dos dispositivos de vitrificación distintos (el cryotop y la ministraw), los cuales proporcionan diferentes velocidades de enfriamiento y calentamiento. Los parámetros que se estudiaron fueron la supervivencia prenatal del embrión, el crecimiento de la descendencia, su fenotipo adulto, su estado de salud, su rendimiento reproductivo y su rendimiento en la lactancia. Las tasas de supervivencia prenatal fueron menores tanto para los embriones transferidos en fresco (FT), como para los transferidos tras su vitrificación (VT), en comparación con aquellos concebidos de forma natural (NC). En comparación con la descendencia NC, los animales FT mostraron una menor tasa de crecimiento que condujo a un menor peso corporal en la edad adulta. Las desviaciones postnatales fueron más altas para la descendencia VT y, aunque ésta mostró un mayor peso al nacer, su tasa de crecimiento y peso corporal adulto fue menor en comparación con los animales FT y NC. Estos resultados demostraron que cada técnica aplicada durante la transferencia de embriones vitrificados tiene un efecto individual *per se*, los cuales, además, son acumulativos. De igual manera, tanto la transferencia de embriones como las técnicas de vitrificación afectaron negativamente el rendimiento de lactación y la composición nutricional de la leche de las hembras adultas. Curiosamente, aunque

el cryotop ejerció un efecto positivo sobre la supervivencia embrionaria, condujo a mayores desviaciones fenotípicas postnatales en comparación con la minitraw. En base a estos resultados, la elección del dispositivo de vitrificación no debe ser considerada una acción trivial. Sin embargo, a pesar de estos cambios fenotípicos, todas las progenies fueron sanas y fértiles. Por lo tanto, en este primer estudio, queda reflejada la gran plasticidad que ofrece el embrión de los mamíferos en su desarrollo ante diferentes factores estresantes *in vitro*.

Una vez quedó demostrado que cada técnica involucrada en la transferencia de embriones criopreservados tiene un efecto *per se*, el objetivo del Capítulo III fue evaluar los efectos del procedimiento completo de transferencia de embriones vitrificados (VET) en el desarrollo de machos y hembras por separado. Para ello, se utilizaron conejos de origen californiano. Nuevamente, detectamos que los animales VT presentaron alteraciones tanto del peso al nacer como en el patrón de crecimiento. Sin embargo, observamos que los machos se vieron más afectados que las hembras. En la edad adulta, los machos fueron sometidos a una autopsia *post mortem* y sus órganos fueron pesados. Comparados con los animales NC, los VT mostraron un peso menor, además de una reducción significativa del peso del hígado y el corazón. Tras ello, se realizó un análisis comparativo del proteoma hepático, tratando de elucidar las marcas moleculares subyacentes a este fenotipo. El análisis funcional de las proteínas diferencialmente expresadas demostró cambios relacionados con la fosforilación oxidativa, el metabolismo del zinc, y el metabolismo lipídico. Estos resultados sugieren que el VET no es un procedimiento neutral. Sin embargo, el análisis sanguíneo (hematológico y bioquímico) reveló que el estado de salud entre los animales VT y NC era comparable.

En el Capítulo IV, las cohortes de animales VT y NC establecidas en el capítulo anterior, se aparearon durante dos generaciones consecutivas, dentro de cada grupo experimental, y sin ninguna manipulación embrionaria. De esta forma, se constituyó un modelo de tres generaciones (F1, F2 y F3) para evaluar los efectos transgeneracionales del VET. En cada generación, se estudió y comparó el desarrollo postnatal de los machos VT y NC. Tras su apareamiento, en cada generación, se realizó un estudio para evaluar la fertilidad de los machos. Posteriormente éstos animales fueron sometidos a una autopsia *post mortem* para examinar los pesos de sus órganos. Los resultados mostraron que los efectos directos (F1) del VET presentaron un carácter intergeneracional (F2) y transgeneracional (F3), puesto que las progenies VT presentaron una menor velocidad de crecimiento y un menor peso corporal adulto comparados con los animales NC coetáneos. Las alteraciones en el hígado y el corazón fueron transmitidas a la F2, pero solo los cambios hepáticos persistieron hasta la F3. Tras ello, se realizó un estudio molecular (transcriptómico y metabolómico) comparativo del tejido hepático entre los animales VT y NC de cada generación. Los datos del RNA-seq revelaron 642 transcritos diferencialmente expresados en la F1, de los cuales 133 fueron heredados por la F2 y

120 por la F3. Concordantemente, 151, 190 y 159 metabolitos diferencialmente acumulados fueron detectados en la generación F1, F2 and F3, respectivamente. El análisis funcional de los datos moleculares demostró alteraciones en el metabolismo del zinc y los ácidos grasos insaturados a lo largo de las tres generaciones. Estos cambios pueden generar alteraciones en una red molecular compleja que puede correlacionarse con el fenotipo mostrado por los animales VT. Sin embargo, la fertilidad fue similar entre los machos VT y NC de cada generación, siendo éste un buen indicador de que el VET no pareció afectar el estado de salud de los animales VT.

Finalmente, a lo largo del Capítulo V, nuestro propósito fue completar nuestro conocimiento previo acerca de los cambios moleculares transgeneracionales que ocurren después del VET en el tejido hepático. Para ello, se realizó una aproximación multi-ómica, y se llevó a cabo un estudio más profundo a nivel metabolómico y un análisis proteómico para validar las consecuencias subyacentes a los cambios moleculares previamente detectados. Además, se realizó un análisis del epigenoma hepático, entendido como posible mecanismo de canalización del estrés embrionario hasta la edad adulta y las generaciones posteriores. Tanto el estudio metabolómico como el proteómico validaron y ampliaron el estudio molecular del capítulo anterior, demostrando alteraciones globales en el metabolismo hepático de los animales VT, principalmente relacionado con alteraciones del metabolismo lipídico (ácidos grasos poliinsaturados, esteroides, hormonas esteroideas...). En general, los resultados indicaron que los trastornos metabólicos participaron en una red compleja de vías fisiológicas que colectivamente podrían apoyar las diferencias observadas entre los animales VT y NC. Además, se detectaron grandes cambios de metilación en el epigenoma hepático, involucrando genes relacionados con el metabolismo lipídico y la apoptosis. De esta forma, se demuestra una herencia transgeneracional de las marcas moleculares inducidas por el VET en los antepasados. Sin embargo, una vez más, en base al estudio sanguíneo (hematológico y bioquímico) el estado de salud de los animales VT fue similar al de los NC.

Así pues, los resultados de esta tesis nos permiten confirmar que la aplicación de un VET en los embriones tempranos tiene consecuencias a largo plazo sobre el fenotipo y la fisiología molecular de la descendencia resultante. Durante años, se ha creído que, aunque el VET puede ser letal, éste no causaba ningún efecto en los embriones que sobrevivían al proceso, por lo que se consideraba una técnica neutral. A lo largo de esta tesis se ha demostrado, por primera vez, que el VET induce una reprogramación embrionaria del desarrollo que persiste hasta la edad adulta y en las generaciones posteriores. Se cree que los mecanismos epigenéticos median esta plasticidad del desarrollo y su herencia transgeneracional, un hecho también avalado por nuestros resultados. Por lo tanto, los diferentes campos que actualmente se nutren de la criopreservación y transferencia de embriones, como la medicina y la producción

animal, deberían evaluar cómo estos procedimientos pueden afectar a la eficiencia o la consecución de sus objetivos.