

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Ciencia Animal
Instituto de Ciencia y Tecnología Animal



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE GONADOTROPINAS
RECOMBINANTES HUMANAS SOBRE LA PRODUCCIÓN Y
CALIDAD DE OVOCITOS Y EMBRIONES EN CONEJA**

Carmela Cortell Nicolau

Diciembre, 2012

Directora: María Pilar Viudes de Castro, colaboradora
científica adjunta, CITA-IVIA

Esta tesis ha sido escrita y presentada como uno de los requisitos para optar al grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad Politécnica de Valencia.

Valencia, Diciembre de 2012

La Doctoranda

La Directora de la Tesis

Fdo. Carmela Cortell Nicolau

Fdo. M. Pilar Viudes de Castro

AGRADECIMIENTOS

Parecía que este momento no iba a llegar nunca, pero por fin ha llegado. Han sido unos años repletos de esfuerzo y sacrificios y es por eso que no hubiera llegado hasta aquí si no hubiera sido por la cantidad de gente que ha formado parte de este proyecto en uno u otro sentido. Así que me encantaría poder agradecer a todas esas personas todo su apoyo.

En primer lugar, debo agradecerle a la Dra. Pilar Viudes haberme dado la oportunidad de empezar este trabajo, pero, sobre todo, haberme dado la oportunidad de llegar hasta el final, a pesar de todos los obstáculos. Muchísimas gracias Pilar, gracias por haber estado ahí, tanto en el ámbito laboral como personal.

Muchas gracias también al Dr. José S. Vicente, que me ha ayudado y aconsejado siempre que lo he necesitado. José, ha sido un lujo poder contar con tu ayuda y conocimientos, muchas gracias.

Los años dedicados a esta tesis no habrían sido tan especiales si no hubiera sido por la gente con la que he “compartido fatigas” en el CITA. Puedo decir tranquilamente que algunos de los grandes amigos que tengo han pasado por ahí, así que muchísimas gracias por estar siempre dispuestos a ayudar en todos los sentidos, muy especialmente (uff... espero no dejarme a nadie...): a Clara, Mar, Arantxa, Irene, Eva, Amparo G., Amparo M., Cris, Paula, Mariam, Alba y Vero. Y claro, al hablar del CITA, no podría no nombrar a Antonio Miguel, que me cuidó a las conejas como nadie y que consiguió que los días de granja fueran mucho menos pesados. Gracias también a la Dra. Eva Mocé, que me brindó su ayuda y conocimientos.

Muchas gracias al grupo del departamento de Ciencia Animal de la UPV: gracias al Dr. Marco Jiménez por estar dispuesto a contestar mis dudas y a orientarme siempre que te lo he pedido. También gracias a Raquel y a Lola, por ayudarme en muchas ocasiones.

Gracias al Dr. Thierry Joly, que me permitió realizar una estancia en su departamento en el ISARA de Lyon, facilitándome todos los recursos necesarios para realizar los experimentos y haciendo que mi estancia allí fuera inolvidable. Muy especialmente, gracias también al Dr. Pascal Salvetti, que además de ser mi compañero de fatigas en Lyon, me ofreció su español y su amistad y me ayudó en todo. ¡Muchas gracias Pascal!

Y, cómo no, el ámbito personal. En primer lugar, muchísimas gracias a mis amigas de siempre, las de toda la vida, por creer en mí y apoyarme y porque siempre consiguen estar ahí cuando se les necesita ¡qué gente!... Muchas gracias a todas.

Muchísimas gracias a mis tías, porque ambas me han apoyado, animado, hecho de público de presentaciones (uff...) y han contribuido a que yo llegara hasta aquí...¡y hasta muchos más sitios! Muchísimas gracias.

Moltes gràcies a la família Ferri, la meua segona família. Gràcies per estar sempre disposats, per cuidar de Jaume i de mi. Molt especialment, gràcies a Isabel i Herme, m'haguera agradat arribar fins ací un any abans. Gràcies.

A mis hermanos, un rinconcito muy especial. Muchas gracias María, siempre tan especial, haciéndome la vida mejor. Muchas gracias Alfredo, por estar siempre ahí y por ser el mejor padrino del mundo. Los dos formáis parte de lo que yo soy, así que también formáis parte de esto.

Y ¿qué voy a decir de mis padres? Sólo puedo decir que todo lo bueno que tengo o que soy, se lo debo a ellos y que esto también se lo debía. Gracias mamá, por ser el pilar y por aportar siempre un punto de vista genial. Gracias papá, por enseñarme la importancia del trabajo y hacerme ser cada día mejor persona.

Per últim, moltes gràcies Isaac, el meu company, la persona en la que he decidit fer aquest camí i els que vinguen, gràcies per compartir-ho tot amb mi, totes les alegries i tots

els sacrificis. Formem part del mateix i de veritat no haguera arribat fins ací sense tu.

Moltíssimes gràcies a tu i a Jaume (i als que venen!), per compartir-ho tot amb mi.

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis era evaluar la utilización de las gonadotropinas recombinantes humanas (rhFSH y rhLH) sobre la respuesta superovulatoria en conejas, estudiando el efecto de la utilización de las mismas sobre la calidad de los ovocitos y embriones obtenidos y sobre la viabilidad embrionaria tras un proceso de criopreservación.

Así, en el primer experimento se evaluó el efecto de la aplicación de 25 UI de rhFSH junto con un 0, 5 o 10% de rhLH sobre el desarrollo de embriones frescos y congelados-descongelados. Se obtuvo una tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto eclosionado significativamente mayor en embriones no superovulados frente a los superovulados con rhFSH y 10% de rhLH. En cuanto a la tasa de desarrollo de los embriones congelados-descongelados, fue similar en todos los grupos, alcanzando el estadio de blastocisto eclosionado el 83.5% de los embriones. Por otra parte, se estudió la evolución de la tasa de ovulación y la respuesta inmunitaria a lo largo del tiempo mediante la aplicación de hasta cuatro tratamientos de superovulación sobre una misma hembra. Se observó que la tasa de ovulación disminuía a partir del segundo tratamiento de superovulación mientras que el nivel de anticuerpos anti-FSH circulantes aumentaba a partir de la tercera aplicación del tratamiento de superovulación.

En el segundo experimento se estudió cómo afectaba tanto el protocolo de administración como la hormona utilizada en el tratamiento de superovulación a la calidad de los ovocitos producidos, analizando la cantidad de ATP presente en los mismos. Para ello, se comparó la administración cada 24 horas de rhFSH y de FSH porcina diluidas en PVP y la administración cada 12 horas de FSH porcina diluida en suero fisiológico. La concentración de ATP en el grupo de FSH porcina diluida en suero fisiológico fue significativamente menor que en los otros dos grupos de superovulación (5.63 ± 0.14 frente a 6.42 ± 0.13 y 6.19 ± 0.15 para el grupo de rhFSH y pFSH, respectivamente). Esa disminución de la concentración de ATP podría estar relacionada con un efecto negativo del tratamiento utilizado sobre el

metabolismo de los ovocitos, lo que explicaría la baja tasa de desarrollo *in vitro* de los embriones obtenidos de hembras superovuladas con FSH porcina diluida en suero fisiológico y administrada cada 12 horas, ya que únicamente el 24.3% de los embriones alcanzaron el estadio de blastocisto eclosionado frente al 80.4% del grupo control (sin superovular).

En el tercer experimento se evaluaba la eficiencia de la técnica laparoscópica en la recuperación *in vivo* de ovocitos en metafase II (16 horas tras la inducción de la ovulación) y embriones (72 horas tras la inseminación artificial e inducción de la ovulación) procedentes de conejas superovuladas con rhFSH frente a conejas control. Cada procedimiento se repitió hasta cuatro veces sobre una misma hembra. La eficiencia de recuperación fue del 58% y del 84% para ovocitos y embriones, respectivamente. No se observaron diferencias entre el grupo de hembras superovuladas y el control. Por otra parte, la eficiencia a lo largo de los cuatro tratamientos era similar, lo que indicaba que era posible maximizar el número de ovocitos y/o embriones de una misma hembra mediante la recuperación repetida por laparoscopia y superovulación con rhFSH.

Por último, en el cuarto experimento se estudió cómo la adición de macromoléculas (PVA y dextrano) a un medio de vitrificación basado en etilenglicol y dimetilsulfóxido podía afectar a los embriones procedentes de hembras sometidas a un tratamiento de superovulación. Para ello, se evaluó el desarrollo *in vitro* de embriones vitrificados y desvitrificados procedentes tanto de hembras control como de hembras superovuladas con rhFSH. La tasa de embriones intactos fue de un 83.2% en el grupo de superovulación frente al 95.8% para el grupo control ($P < 0.05$). Por otra parte, ni el tratamiento de superovulación ni el medio de vitrificación utilizado afectaron a la tasa de desarrollo de los embriones intactos tras la desvitrificación. Por último, decir que la adición de dextrano en el medio de vitrificación aumentaba la protección frente a daños estructurales y permitía reducir la cantidad de dimetilsulfóxido en el medio de vitrificación.

RESUM

Mitjançant els treballs realitzats a aquesta tesi es pretén valorar el efecte de la FSH recombinant humana (rhFSH) sobre la superovulació de conilles, així com el impacte del seu ús sobre la qualitat dels òvuls i embrions obtinguts i la viabilitat dels mateixos després de ser sotmesos a un procés de crioconservació.

Amb aquest objectiu, al primer experiment es va avaluar l'efecte de la superovulació sobre el desenvolupament d'embrions frescs i descongelats mitjançant l'aplicació de 25 UI de rhFSH sola, amb el 5 o amb el 10% de LH recombinant humana. Així, es va obtenir una taxa de desenvolupament fins al estadi de blastòcit escapant-se significativament major per als embrions no superovulats que per als superovulats mitjançant la rhFSH amb 10% de LH. La taxa de desenvolupament dels embrions després de ser sotmesos a un procés de congelació lenta va ser semblant per a tots els grups, assolint l'estadi de blastòcit expandit el 83.5% d'embrions. D'altra banda, es va analitzar l'eficiència del tractament de superovulació basat en la rhFSH després de quatre aplicacions, valorant l'evolució de la taxa d'ovulació obtinguda, així com la resposta immunitària de les femelles emprades. La taxa d'ovulació va disminuir a partir del segon tractament de superovulació. Paral·lelament, cap femella va presentar un augment de la taxa d'anticossos anti-FSH fins al tercer cicle de tractaments.

Al segon experiment es va estudiar com afectaven diferents protocols superovulatoris a la qualitat dels ovòcits produïts analitzant la quantitat de ATP present a aquests després del procés de superovulació. Així, es va comparar l'administració d'un tractament control front l'administració cada 24 hores de rhFSH diluïda en PVP, l'administració cada 24 hores de FSH porcina diluïda en PVP i l'administració cada 12 hores de FSH porcina diluïda en sèrum salí. A aquest últim grup, la concentració d'ATP va ser significativament menor que als altres dos grups de superovulació (5.63 ± 0.14 front a 6.42 ± 0.13 y 6.19 ± 0.15 per als grups amb rhFSH i pFSH, respectivament). Respecte al desenvolupament *in vitro* dels embrions recuperats de femelles superovulades amb FSH porcina cada 12 hores, només el

24.28% va assolir la fase de blastòcit escapat front al 80.39% del grup control, la qual cosa indicaria que la disminució del contingut d'ATP podria estar relacionada amb un efecte negatiu sobre el metabolisme dels ovòcits.

El següent pas va consistir en la valoració de l'eficiència de la tècnica laparoscòpica per a la recuperació *in vivo* d'òvuls de en metafase II (recuperats 16 hores després d'induir l'ovulació) i embrions (recuperats 72 hores després de la inseminació artificial) tant en conilles superovulades amb rhFSH, amb conilles no superovulades. Cada femella es va sotmetre fins a quatre cicles de recuperació. L'eficiència de recuperació va ser del 58% i 84% per a òvuls i embrions respectivament i no va ser diferent entre el grup de femelles superovulades i el del grup control. D'altra banda, no es va observar cap disminució de l'eficiència de recuperació al llarg dels quatre cicles de recuperacions, la qual cosa indicaria que la recuperació repetida per laparoscòpia d'òvuls i embrions de conilles superovulades amb rhFSH podria maximitzar el número dels mateixos obtinguts d'una mateixa femella.

Per últim, donada la importància de l'ús de la crioconservació dels embrions recuperats, es va portar a terme l'estudi de l'adició de dos macromolècules (PVA i dextran) a un medi de vitrificació basat en etilenglicol i dimetilsulfòxid. Així, es va avaluar el desenvolupament *in vitro* d'embrions vitrificats i desvitrificats provinents tant de femelles no superovulades com de femelles superovulades amb rhFSH. Si bé no es van observar diferències a les taxes de desenvolupament obtingudes després de la desvitrificació, la taxa d'embrions intactes per al grup de superovulats va ser menor que per al grup control (83.2% front al 95.8%, respectivament). Per últim, l'adició de dextran en el medi de vitrificació també va reflectir un augment de la protecció front a danys estructurals a comparació de l'ús de PVA, tot i reduint la quantitat de dimetilsulfòxid utilitzada.

ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate the use of recombinant human FSH on rabbit does superovulation, embryo and oocytes quality and its viability after a cryopreservation process.

The first experiment aimed to evaluate the effect of superovulation treatment on fresh and frozen -thawed embryo development using 25 UI rhFSH alone or in combination with 5% or 10% rhLH. Development rate to hatching blastocyst was significantly higher for non-superovulated embryos than for rhFSH or rhFSH+10% rhLH superovulated embryos. No differences were found among superovulation groups in development rate after frozen-thawed process, with an 83.5% of embryos reaching expanded blastocyst stage. On the other hand, antiFSH antibodies were detected in order to evaluate the efficiency of rhFSH treatment on does subjected to four treatments. Ovulation rate decreased after the second treatment, while a significant increase in the antibody levels increased at the moment of the third and fourth superovulation treatments.

The aim of the second experiment was to study the effect of different superovulation treatments on oocyte quality evaluating its ATP content. Thus, control treatment, rhFSH every 24 hours treatment (rhFSH3), porcine FSH every 24 hours treatment (pFSH3) or porcine FSH every 12 hours treatment (pFSH5) were performed. ATP level was significantly lower than others groups (5.63 ± 0.14 for pFSH group vs. 6.42 ± 0.13 and 6.19 ± 0.15 for rhFSH3 and pFSH3, respectively; $P < 0.05$). Otherwise, females treated with pFSH5 protocol, only a 24.28% of ova developing into hatched blastocysts after *in vivo* fertilization, compared to an average of 80.39% for control group ($P < 0.0001$). Thus, it is possible that, after this superovulation treatment, the oocyte metabolism would be affected.

The third experiment was designed in order to assess the efficiency of *in vivo* oocyte and embryo recovery after a recombinant human FSH (rhFSH) treatment in rabbit does. With this aim, *in vivo* laparoscopy technique was used in order to collect the oocytes (16 hours after ovulation induction) and the embryos (72 hours after artificial insemination) in

superovulated and non-superovulated females. Up to four recoveries were performed with each doe. Recovery efficiencies differed significantly between embryos (84%) and oocytes (58%). Yet, the recovery rates for the superovulation and control groups did not differ. Moreover, the recovery efficiency after the four treatments did not decrease, therefore, results from this study indicate that repeated in vivo oocyte and embryo recovery from rhFSH superovulated does maximizes the number of oocytes or embryos collected from the same female.

The last experiment was performed in order to evaluate the effect of macromolecules addition (PVA and dextran) in rabbit embryo vitrification media, using Ethylene-glycol and Dimethyl-sulfoxide as cryoprotectants. There was a significantly higher proportion of embryos without damages in mucin coat or zona pellucida after warming (undamaged embryos) in the control than in the superovulation group (95.8% vs. 83.2%, respectively). The addition of dextran to the vitrification media improve the preservation of rabbit embryos and permits to reduce the amount of DMSO for vitrification. Additionally, in vitro developmental ability of undamaged embryos were not affected by superovulation treatment nor vitrification media.

ÍNDICES



INTRODUCCIÓN	17
1.1. Aspectos básicos de la fisiología reproductiva en la coneja	21
1.1.1. <i>Desarrollo folicular</i>	23
1.1.2. <i>Maduración ovocitaria</i>	25
1.1.2.1. <i>Maduración nuclear o meiótica del ovocito</i>	25
1.1.2.2. <i>Maduración citoplasmática</i>	26
1.1.2.3. <i>Maduración molecular</i>	28
1.1.3. <i>Ovulación y formación del cuerpo lúteo en la coneja</i>	29
1.1.4. <i>Transporte de gametos y desarrollo embrionario preimplantacional.</i>	30
1.2. Tratamientos de superovulación	32
1.2.1. <i>Factores que afectan a los tratamientos de superovulación</i>	33
1.2.1.1. <i>Hembra (raza o línea e individuo)</i>	33
1.2.1.2. <i>Tratamiento hormonal: pautas de tratamiento, efectos negativos y composición</i>	34
1.3. Recuperación de ovocitos y embriones	41
1.3.1. <i>Métodos de recuperación de embriones</i>	41
1.3.2. <i>Métodos de recuperación de ovocitos</i>	43
1.4. Crioconservación de ovocitos y embriones	45
1.4.1. <i>Factores que afectan a la crioconservación</i>	45
1.4.1.1. <i>Procedimiento</i>	45
1.4.1.2. <i>Crioprotectores</i>	48
1.4.1.3. <i>Otros factores</i>	50
1.4.2. <i>Crioconservación de ovocitos frente a crioconservación de embriones</i>	52
1.4.3. <i>El caso del conejo. Crioconservación de embriones</i>	53
1.5. Valoración de la calidad de embriones y ovocitos	55

1.5.1. Apariencia morfológica	55
1.5.2. Actividad metabólica	57
1.5.3. Expresión génica	61
1.5.4. Viabilidad	64
OBJETIVOS	65
PARTE EXPERIMENTAL	69
3.1. Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments	73
3.1.1 Abstract	73
3.1.2. Introduction	74
3.1.3. Materials and methods	76
3.1.3.1. Experiment 1	76
3.1.3.2. Experiment 2	79
3.1.4. Results	81
3.1.4.1. Experiment 1	81
3.1.4.2. Experiment 2	84
3.1.5. Discussion	84
3.1.6. References	88
3.2. Effect of superovulation treatment on rabbit oocyte ATP concentration and developmental competence	95
3.2.1. Abstract	95
3.2.2 Introduction	96
3.2.3. Material and Methods	97
3.2.4. Results	101
3.2.5. Discussion	103

3.2.6. <i>References</i>	106
3.3. Efficiency of Repeated In Vivo Oocyte and Embryo Recovery After rhFSH treatment in Rabbits	113
3.3.1. <i>Abstract</i>	113
3.3.2. <i>Introduction</i>	114
3.3.3. <i>Material and Methods</i>	115
3.3.4. <i>Results</i>	118
3.3.5. <i>Discussion</i>	121
3.3.6. <i>References</i>	124
3.4. Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo	131
3.4.1. <i>Abstract</i>	131
3.4.2. <i>Introduction</i>	132
3.4.3. <i>Material and methods</i>	133
3.4.4. <i>Results</i>	137
3.4.5. <i>Discussion</i>	139
3.4.6. <i>References</i>	142
DISCUSIÓN GENERAL	147
CONCLUSIONES	161
REFERENCIAS	165

Figura 1. Esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la coneja.....	22
Figura 2.-Representación del desarrollo folicular y ovocitario.	24
Figura 3. Representación esquemática de la distribución de los orgánulos durante la maduración, fecundación y primer estadio embrionario.....	26
Figura 4. Figura esquemática de la progresión de los ovocitos a través del oviducto durante las primeras 48 horas p.c.....	31
Figura 5. Figura esquemática de la técnica de PCR a tiempo real	62
Figura 6. Experimental design resume. Experiment 3.1.1.....	79
Figura 7. Experimental design resume. Experiment 3.1.2.....	81
Figura 8. Experimental design resume. Experiment 3.2.....	99
Figura 9. Experimental design resume. Experiment 3.3.....	118
Figura 10. Experimental design resume. Experiment 3.4.....	136

Tabla 1.1. Resumen de diferentes protocolos de superovulación mediante el uso de eCG.....	35
Tabla 1.2. Resumen de diferentes protocolos de superovulación mediante el uso de FSH.....	36
Tabla 1.3. Ventajas e inconvenientes de los procesos de congelación y vitrificación.....	48
Tabla 1.4. Principales factores que afectan al éxito del proceso de criopreservación.....	51
Tabla 1.5. Resumen de diferentes protocolos de criopreservación en función del crioprotector utilizado.....	54
Tabla 1.6. Principales estructuras morfológicas observables en los ovocitos.....	57
Tabla 1.7. Principales valoraciones metabólicas en los ovocitos.....	60
Tabla 1.8. Impacto de los diferentes parámetros en abundancia de ARN mensajero en embriones y ovocitos.....	63
Tabla 3.1.1. Effect of embryo production treatment on recovery variables (least square means± standard error).....	82
Tabla 3.1.2. <i>In vitro</i> viability of embryos.....	83
Tabla 3.1.3. Effect of repeated rhFSH treatment (S1 to S4) on ovulation rate and anti-FSH antibody production (least square means±standard error).....	84
Tabla 3.2.1. Effect of superovulation treatment on ovulation rate and number of oocytes recovered (LSM±Standard error).....	101
Tabla 3.2.2. Effect of superovulation treatment and culture temperature on ATP content (LSM±Standard error).....	102
Tabla 3.2.3. Effect of pFSH5 superovulation treatment on developmental competence (LSM±Standard error).....	102

Tabla 3.3.1. Ovulation rate and number of embryos and oocytes collected along the cycle repetitions. LSM (Last square means±standard error).....	119
Tabla 3.3.2. Ovulation rate and number of embryos and oocytes collected after laparoscopy recovery from the two superovulation treatment groups. LSM (Last square means±standard error).....	120
Tabla 3.3.3. Recovery rate along the cycle repetitions. Least square means ± standard error.....	120
Tabla 3.4.1. Vitrification solutions composition.....	134
Tabla 3.4.2. Effect of treatment and vitrification medium on embryo integrity (mean ± standard error).....	138
Tabla 3.4.3. Effect of treatment and vitrification medium on development potential of embryos (mean ± standard error).....	139

Imagen 1. Perfusión del oviducto y cuerno uterino tras su resección mediante laparotomía.....42

Imagen 2. Método de recuperación de embriones y /o ovocitos por laparoscopia.....43

ABREVIATURAS

- Ψ_m** : Potencial de la membrana
- ADN**: Ácido desoxirribonucleico
- ADNmt**: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- ANOVA**: Análisis de la varianza
- ARN**: Ácido ribonucleico
- ARNm**: Ácido ribonucleico mensajero
- AT**: Ámpulo-tubárica
- ATP**: Adenosin trifosfato
- BSA**: Albúmina sérica bovina
- BCB**: Azul cresil brillante
- COC**: Complejo cúmulo-ovocito
- DAPI**: 4',6-diamino-2-fenilindol
- DCF**: 2',7'-diclorofluoresceína
- DCHF**: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
- DCHFA**: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
- DMSO**: Dimetil sulfóxido
- eCG**: Gonadotropina coriónica equina
- EG**: Etilenglicol
- ELISA**: Enzime-linked immunosorbent assay
- ER**: Embriones recuperados
- FAO**: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
- FSH**: Hormona estimulante del crecimiento folicular
- G6PDH**: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
- GLM**: General linear model
- GV**: Vesícula germinal
- GVBD**: Rotura de la vesícula germinal
- H₂O₂**: Peróxido de oxígeno
- hCG**: Gonadotropina coriónica humana

IA: Inseminación artificial

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

IO: Inducción de ovulación

JC-1: 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil

LCA-FITC: Leukocyte Common Antigen- Fluorescein isothiocyanate

LH: Hormona luteinizante

MI: Meiosis I

MII: Meiosis II

MCI: Masa celular interna

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OR: Ovulation rate

PI: Profase I

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pFSH: FSH porcina

PROH: 1,2-propanediol

PVA: polivinil alcohol

PVP: Polivinilpirrolidona

p.c.: Post coito

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rhFSH: FSH recombinante humana

rhLH: LH recombinante humana

TO: Tasa de ovulación

TUNEL: deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling

UI: Unidades internacionales

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la producción ganadera se ve sometida a continuos cambios y exigencias, viéndose obligada a hacer frente a los nuevos retos que se presentan e intentando mejorar la productividad de las explotaciones.

La biotecnología reproductiva dispone de diferentes herramientas que se pueden implementar a nivel comercial (inseminación artificial, crioconservación de gametos y embriones, superovulación, transferencia embrionaria...) algunas de las cuales hacen posible que animales de alto valor genético puedan producir más descendencia de la que sería posible gracias a la reproducción natural, acelerando así la mejora genética de los animales ya que acortan el intervalo generacional.

Por otra parte, en las últimas décadas se ha venido realizando un esfuerzo desde la FAO y desde los propios países, por mantener la diversidad genética, tanto a nivel de especie como a nivel de raza o línea (FAO, 2007), ya que el interés de la conservación de recursos genéticos es importante desde el punto de vista zootécnico, así como desde el punto de vista sociológico en aquellas razas en las que su valor no es únicamente el productivo (Joly *et al.*, 1996; Medjdoub, 2000; Mermillod *et al.*, 1999).

En el caso del conejo, no podemos olvidar su importancia como modelo biomédico tanto en el ámbito de la biotecnología y la reproducción, como en el ámbito del estudio de enfermedades. Así, por un lado, mientras la conservación del material genético de las líneas criadas con estos fines resulta especialmente importante, por otro, las propias técnicas de producción y/o conservación de este material genético sirven en sí mismas para el estudio de la fisiología reproductiva tanto en ésta como en otras especies.

Uno de los recursos íntimamente relacionados con la mejora genética es la conservación *ex situ* de material genético que, según define la FAO, comprende la conservación de material genético en un medio artificial, normalmente en condiciones criogénicas, de semen, ovocitos, embriones,

células o tejidos (FAO, 2007). De hecho, la mayor parte de los programas de conservación de recursos genéticos se basan en la formación de bancos de semen y embriones, considerando que la conservación *ex situ* debería ser comprendida como un complemento de la conservación *in situ*, (Joly *et al.*, 1996; Holt and Pickard, 1999; Bolet *et al.*, 2000).

Al plantearse la conservación *ex situ* de una línea o raza, es necesario valorar qué tipo de células o tejidos van a conservarse. A este respecto hay diferentes posibilidades: crioconservación de semen, de embriones, de ovocitos e incluso la conservación de tejidos más complejos como, por ejemplo, el tejido ovárico. El hecho de que la mayor parte de programas de conservación se basen en la conservación de semen y embriones podría deberse a causas como la facilidad en la formación de un banco de semen (Boettcher *et al.*, 2005) o la inmediatez en la obtención de descendencia en el caso de los embriones, ya que tan sólo hace falta la transferencia de los mismos a hembras receptoras para su obtención (Joly, 1997). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que, en caso de tener que recuperar una población, podría llevarse a cabo tan sólo con un banco de semen realizando retrocruzamientos, si bien habría que asumir el hecho de que nunca podría recuperarse el 100% de la genética original (Boettcher *et al.*, 2005); de ahí que sea aconsejable combinar, al menos, dos tipos de muestras en la formación de un banco(Boettcher *et al.*, 2005).

En cuanto a la utilización de ovocitos para la conservación *ex situ*, es necesario tener en cuenta su escasa eficiencia en la congelación y/o vitrificación, así como, en caso de recuperarlos en un estadio de vesícula germinal, la necesidad de madurarlos *in vitro*, con la consecuente disminución de la efectividad del proceso global (Shaw *et al.*, 2000). Además, la obtención de un individuo a partir de un ovocito es un proceso indirecto, ya que se requieren una serie de pasos, como el de maduración o fecundación *in vitro*, que suponen una disminución en la eficiencia del proceso.

Dado que la viabilidad de los embriones parece no disminuir en función del tiempo de conservación de los mismos en nitrógeno líquido (Salveti *et al.*, 2007a; Lavara *et al.*, 2011), la

conservación de este tipo de muestras ha permitido en conejo, entre otras aplicaciones, la difusión de la mejora genética a través de la exportación de embriones (García *et al.*, 2000) o la evaluación de los programas de mejora aplicados (Santacreu *et al.*, 2000; García *et al.*, 2003b; Vicente *et al.*, 2003).

En el caso de la coneja, la obtención de ovocitos o embriones cobra especial importancia en su posible aplicación en biotecnología, aspecto particularmente relevante en esta especie por su utilización como modelo animal. En muchas ocasiones la utilización del conejo como patrón de enfermedades humanas se basa en la utilización de poblaciones de animales transgénicos (Hirabayashi *et al.*, 2000; Houdebine, 2005; Soler *et al.*, 2005). En otras áreas de investigación el citoplasma de los ovocitos de coneja es empleado como receptor para la transferencia nuclear (Zhao *et al.*, 2006; Chesne *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Asimismo, también se emplea la técnica de inyección espermática intracitoplasmática, ICSI (Yamamoto *et al.*, 1999; Ogonuki *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005), para todo lo cual se requiere la utilización bien de embriones o bien de ovocitos.

1.1. Aspectos básicos de la fisiología reproductiva en la coneja

Para poder llevar a cabo la superovulación, recuperación y crioconservación de embriones y ovocitos, es fundamental conocer los aspectos reproductivos básicos de la especie con la que se trabaja. El caso de la coneja presenta determinadas peculiaridades que la distinguen de otras especies, de entre las que probablemente la más importante sea la de no presentar ciclo estral y, por tanto, presentar ovulación inducida. Aun así, la mayoría de procesos que sufren los ovocitos antes de la ovulación y en las primeras horas tras la misma es similar en las diferentes especies.

En la figura 1 se presenta un esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en esta especie.

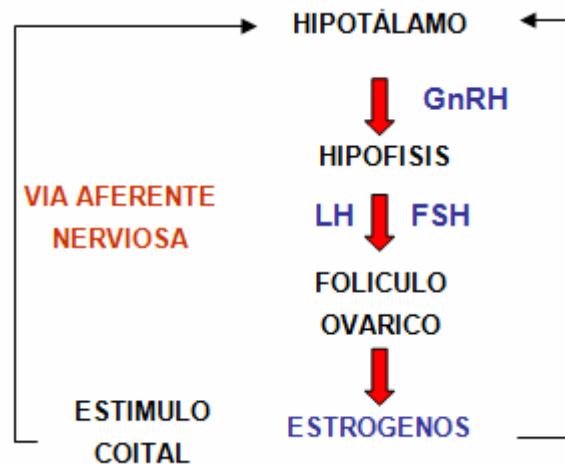


Figura 1. Esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la coneja.

Antes de explicar con más detalle el desarrollo folicular y ovárico, es interesante reflejar a modo de resumen las hormonas involucradas en el control del ciclo estral, así como el funcionamiento del mismo en la coneja y su impacto en el comportamiento de ésta y la realización de la monta. Estas hormonas son principalmente la hormona estimulante folicular (FSH) y la hormona luteinizante (LH); ambas actúan a nivel ovárico y son secretadas por la hipófisis tras recibir el estímulo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo, aunque, como veremos más adelante, tienen funciones bien distintas. En el caso de la coneja, es la monta el estímulo que desencadena la liberación de GnRH y, por tanto, la ovulación.

Con el objetivo de establecer el modo de aumentar la producción de ovocitos o embriones alterando mínimamente la calidad de los mismos, es necesario conocer el complejo proceso de maduración que éstos sufren previamente a la ovulación y en qué modo las hormonas circulantes influyen en él, ya que éste es un proceso que depende tanto de la estimulación de la FSH y la LH, como de la interacción folículo-ovocito (Hillier, 2009).

1.1.1. Desarrollo folicular

No se podría entender la maduración ovocitaria sin hacer referencia al folículo, unidad funcional del ovario (Mehlmann, 2005). Cuando las células de la granulosa forman una capa que rodea completamente al ovocito, el folículo primordial se transforma en folículo primario. Esta etapa es independiente de las gonadotropinas; ya que los precursores de esta activación se originan en las células de la teca y de la granulosa, poniendo de relieve la importancia de las uniones GAP entre éstas y el ovocito, cuya comunicación bilateral es imprescindible para una correcta ovogénesis y foliculogénesis (Gilchrist *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008). La hipertrofia del ovocito, así como la proliferación de las células de la granulosa continúan para formar el folículo secundario y, posteriormente, cuando ya existen 6 o 7 capas de células de la granulosa, el folículo preantral, que, si bien ya posee la capacidad de responder a la FSH, no dependen de ella (Sirard *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008).

A partir de este momento, se va formando el antro y las células de la granulosa pasarán a diferenciarse anatómica y funcionalmente en células del cúmulo, íntimamente ligadas al ovocito (Gilchrist *et al.*, 2008), cuyas proyecciones citoplasmáticas penetran en la zona pelúcida del ovocito a través de uniones GAP dando lugar así a la estructura conocida como complejo cúmulo-ovocito (COC) (Albertini *et al.*, 2001). Esta estrecha relación permite la regulación de la ovogénesis, ya que tanto las células del cúmulo como el mismo ovocito participan de esta regulación mediante la secreción de diversos factores en sentido bidireccional (Gilchrist *et al.*, 2008).

Es en esta etapa antral temprana en la que algunos ovocitos serán reclutados para seguir creciendo (Mehlmann, 2005; Sirard *et al.*, 2006), mientras que el resto, es decir, la mayor parte de ellos, sufrirá atresia inducida por la apoptosis folicular (Tilly *et al.*, 1991). Cuando los ovocitos alcancen la etapa antral, adquirirán la capacidad de retomar la meiosis (Rodrigues *et al.*, 2008) y comenzarán a ser FSH-dependientes. En la figura 2 se presenta un esquema del desarrollo folicular.

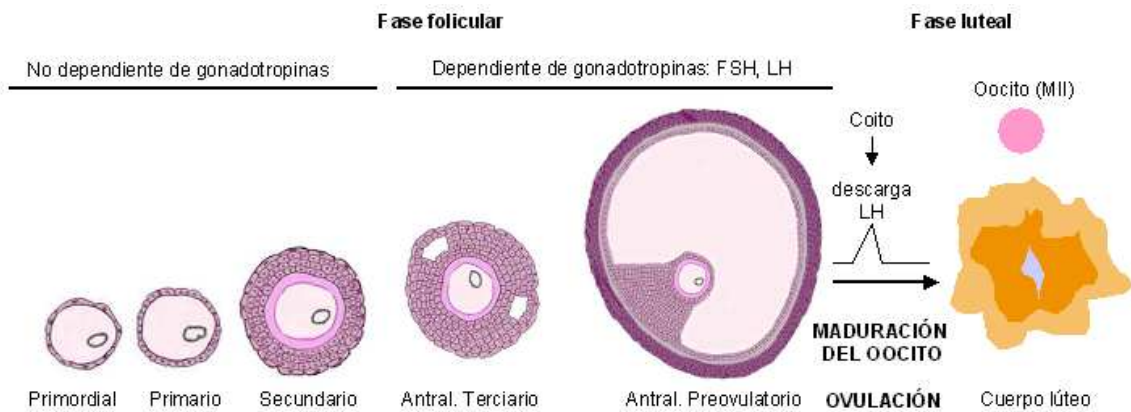


Figura 2. Representación del desarrollo folicular y ovocitario. Adaptado de Mermillod *et al.* (1999).

En cuanto a los posibles factores que influyen en la selección de los folículos reclutables, los folículos pequeños presentan una expresión muy débil de factores reguladores como la activina, la inhibina (que estimulan e inhiben respectivamente la secreción de FSH) o la folistatina (que inhibe la FSH seguramente mediante su unión a la activina), de modo que cabe pensar que, junto con otros factores, regulan la selección de los folículos que continuarán madurando, ya que la activina de los folículos grandes inhibe el crecimiento de los pequeños (Rodrigues *et al.*, 2008). Por otra parte, las células de la granulosa secretan gran cantidad de estradiol-17 β , que, a su vez, provocan un aumento en la cantidad de FSH provocando una retroalimentación positiva (Rodrigues *et al.*, 2008).

En el caso de la coneja, en su ovario se van desarrollando folículos con la capacidad potencial de llegar madurar, alcanzando un diámetro superior a 900 μm y es también la presencia de esos mismos folículos maduros la que inhibe el crecimiento de folículos terciarios con un diámetro inferior, seguramente debido a la liberación de estrógenos por parte de los primeros. Sin embargo, las oleadas de crecimiento y regresión folicular se superponen, produciéndose así el proceso de atresia de forma prácticamente constante (Kranzfelder, 1984).

En aquellos ovocitos listos para madurar, durante las primeras horas de la maduración ovocitaria, tras la unión de la hormona LH con sus receptores, presentes en las células murales de la

granulosa (Mehlmann, 2005; Sirard *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008), las células del cúmulo juegan un papel fundamental (Merton *et al.*, 2003), ya que es en las 12 primeras horas tras el pico de LH cuando se produce la disrupción de las uniones entre las células del cúmulo y el ovocito (Tosti, 2006), así como su expansión y modificación (Greve and Callesen, 2001). De hecho, la reanudación de la meiosis podría estar inducida por la generación de señales que se transfieren al ovocito, por la pérdida de contacto entre el ovocito y el ambiente folicular o por ambas (Tosti, 2006).

1.1.2. Maduración ovocitaria

Los diversos reajustes que deben darse a lo largo de la maduración del ovocito comprenden cambios tanto a nivel nuclear como citoplasmático, dos procesos que, si bien son diferentes, están relacionados y son simultáneos. Así, podríamos dividir el proceso de maduración en tres eventos: la maduración meiótica, la maduración citoplasmática y la maduración molecular (Sirard *et al.*, 2006).

1.1.2.1. Maduración nuclear o meiótica del ovocito

La maduración meiótica es la cascada de eventos nucleares inducida por el pico preovulatorio de LH, mediante la cual el ovocito, suspendido en el estadio de profase I hasta ese momento, debido a la pérdida de las uniones GAP entre el cúmulo y el oocito, progresa hasta el estadio de metafase II (MII), produciéndose la extrusión del primer corpúsculo polar (Sirard *et al.*, 2006).

El primero de los pasos para la reanudación de la meiosis es la rotura de la membrana nuclear y, por tanto, el paso de vesícula germinal, estadio en el que el aspecto de los cromosomas es difuso y permite un período activo de síntesis de ARN, a Metafase I (MI); a este proceso se le conoce como rotura de vesícula germinal (germinal vesicle break down, GVBD). Seguidamente, el ovocito adquiere la capacidad de pasar de la MI a la Metafase II (MII) (Rodrigues *et al.*, 2008). En conejas, se han observado dos estadios morfológicos dentro de la fase de vesícula germinal: uno caracterizado por la presencia de cromatina laxa, en el cual se pueden distinguir las fibras de cromatina, y otro en el

que la cromatina está condensada y es el paso previo a la rotura de la vesícula germinal (Jelinkova *et al.*, 1994). En definitiva, la maduración nuclear comprende la GVBD, la condensación de cromosomas, la formación del huso en la MI, la separación de los cromosomas homólogos con la extrusión del primer corpúsculo polar y el mantenimiento en MII hasta el momento de la fecundación (Kubelka *et al.*, 1988). Tras la fecundación, el calcio intracelular aumenta y el factor citoestático disminuye, permitiendo que el ovocito complete la MII y se produzca la extrusión del segundo corpúsculo polar (Chen *et al.*, 2003).

1.1.2.2. Maduración citoplasmática

El segundo nivel de maduración ovocitaria es el citoplasmático, proceso menos definido y claro que el anterior y que empieza unos días antes del pico de LH (Sirard *et al.*, 2006). Uno de los eventos más importantes que incluye es la reorganización de los orgánulos celulares, que transcurre en función de las necesidades en cada etapa (Ferreira *et al.*, 2009).

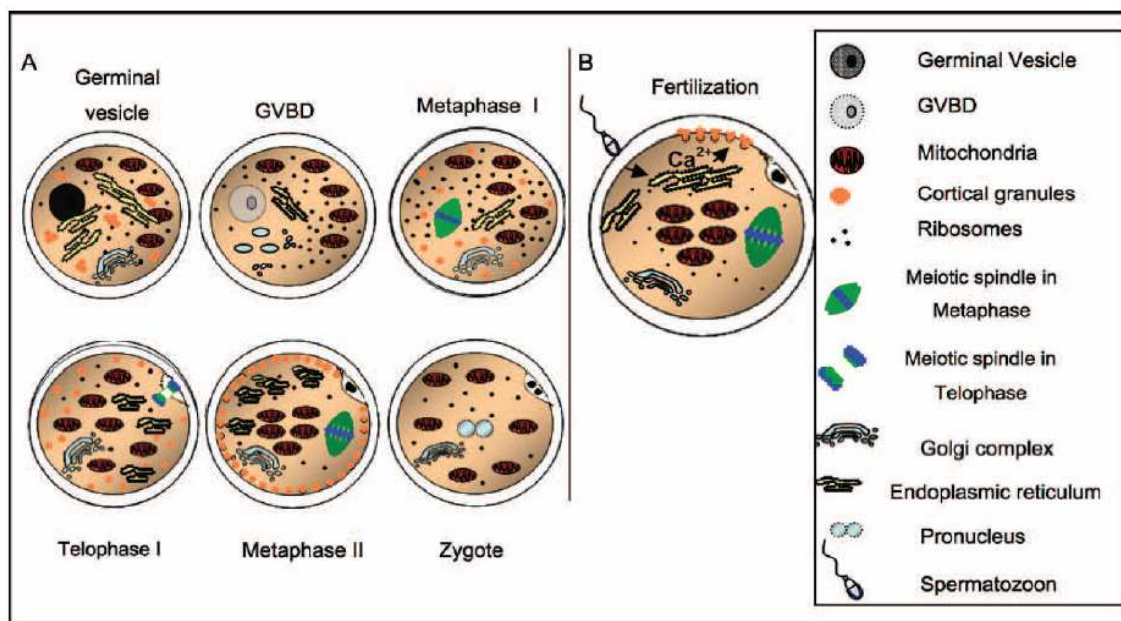


Figura 3. Representación esquemática de la distribución de los orgánulos durante la maduración, fecundación y primer estadio embrionario. Adaptado de Ferreira *et al.* (2009).

El citoesqueleto es el sistema responsable de la segregación de los cromosomas durante la meiosis y la mitosis, de la división celular durante la citocinesis y del tráfico de orgánulos en el interior de la célula (Alberts *et al.*, 2003). Estos filamentos están formados por diferentes subunidades, entre ellas los microtúbulos, que, al entrar en la fase de meiosis se sitúan cercanos a la cromatina condensada tras la GVBD y son los responsables de la formación del huso meiótico y de la placa metafásica en las dos fases de meiosis. De hecho, el grado de centralización del núcleo en la profase I (PI) está relacionado con la tasa de maduración obtenida (Azoury *et al.*, 2009).

A lo largo del proceso de maduración, la actividad del nucleolo va cambiando, ya que es el momento en que se da una alta síntesis de ribosomas y de transcripción de ARN, para conseguir así la síntesis y almacenamiento de las proteínas necesarias para la maduración y el posterior desarrollo embrionario (Ferreira *et al.*, 2009), ya que el genoma embrionario en el conejo no se activará hasta el estadio de 8 células (Telford *et al.*, 1990).

Uno de los orgánulos especialmente importante durante la maduración es la mitocondria, que, a pesar de tener una estructura considerada primitiva en estos estadios, es la encargada de suministrar energía a la célula a lo largo del proceso a través de la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa (Van Blerkom, 2010). A lo largo del proceso de maduración, tanto el número de mitocondrias como el patrón de distribución de las mismas cambia, pasando de formar agrupaciones corticales ("clusters") a dispersarse tras la extrusión del corpúsculo polar (Kruip, 1983). Pero no sólo el número y la distribución de las mitocondrias influyen en una correcta maduración de los ovocitos, el potencial de membrana de las mismas ($\Delta\Psi_m$) también está relacionado con la adquisición de la competencia para el desarrollo (Van Blerkom *et al.*, 2002; Van Blerkom, 2008), de hecho, está relacionado con las otras funciones de la mitocondria, como la transducción de señales, el mantenimiento de la homeostasis del calcio, y la apoptosis (Van Blerkom, 2010).

Otro orgánulo cuyos cambios estructurales y bioquímicos durante la ovogénesis son críticos, es el retículo endoplasmático (RE), involucrado en el almacenamiento y liberación del Ca, proceso extremadamente importante en las señales intracelulares (Ferreira *et al.*, 2009), que tiene una implicación directa en la reanudación de la meiosis y en la evolución de la misma (Tosti, 2006).

Una característica de los ovocitos madurados es el patrón de distribución de los gránulos corticales, ya que, en la etapa de VG se distribuyen en pequeñas agrupaciones por todo el citoplasma de forma difusa, mientras que, al alcanzar la fase de MII, estas agrupaciones aparecen en la zona cortical cercanas a la parte interna de la membrana plasmática, preparados para su exocitosis tras la entrada del espermatozoide (Ferreira *et al.*, 2009). En ovocitos de conejo madurados *in vitro*, se ha conseguido determinar un patrón de distribución de los mismos, estando el patrón difuso asociado en su mayoría a fases en estadio de vesícula germinal, y el patrón cortical, asociado a ovocitos en fase de metafase, aunque son necesarios más estudios para determinar si existe o no un patrón de distribución periférica completa, como se ha descrito en otras especies (Arias-Álvarez *et al.*, 2007).

1.1.2.3. Maduración molecular

Por último, distinguimos la maduración molecular, fundamental para la promoción de las cascadas moleculares apropiadas para que se produzca la activación del genoma embrionario (Sirard *et al.*, 2006). Ésta incluye la transcripción, almacenamiento y procesamiento del ARNm (Ferreira *et al.*, 2009).

Por otra parte, para completar la maduración correctamente, es necesaria la producción y almacenamiento de diferentes moléculas como el glutatión (fundamental en la protección de las células frente a las especies reactivas al oxígeno (ROS), cuya cantidad aumenta desde la fase de VG a MII, la catalasa, el adenosín trifosfato (ATP) o la superoxidodismutasa (Ferreira *et al.*, 2009). Dado que el metabolismo oxidativo es la principal fuente de energía durante la maduración (Krisher, 2004) y tanto la división celular, como la movilización del sistema de microfilamentos requieren altos

niveles de energía (Lee *et al.*, 2006b), se considera esencial una producción adecuada de ATP. De hecho, parece que determinados defectos metabólicos están asociados a fallos preimplantatorios (Van Blerkom *et al.*, 1995) y que existe una relación entre la concentración de ATP de los ovocitos y la capacidad de desarrollo de los embriones resultantes (Van Blerkom *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001; Cummins, 2002; Van Blerkom, 2004; Tamassia *et al.*, 2004). Sin embargo, este tipo de metabolismo genera una cantidad de ROS que podría no permitir la supervivencia embrionaria si no fuese neutralizada, tarea en la que interviene principalmente el glutatión, que juega un papel esencial en la detoxificación y la antioxidación de compuestos tanto endógenos como exógenos y en el mantenimiento del status redox de la célula (Luberda, 2005).

1.1.3. Ovulación y formación del cuerpo lúteo en la coneja

Como se ha señalado anteriormente, la coneja no presenta un ciclo estral como la mayoría de especies, sino que es de ovulación inducida. De este modo, es la monta el estímulo neuroendocrino que induce la secreción de GnRH (Pau and Spies, 1986), produciendo así la liberación de LH por parte de la hipófisis y, por tanto, la maduración del ovocito y su ovulación entre las 10 y las 11 horas tras la inducción de la misma (Seitz *et al.*, 1970; Pau *et al.*, 2000). Por lo que, en caso de llevar a cabo la inseminación artificial (IA), se deben administrar análogos de la GnRH a las hembras para inducir así la ovulación.

De este modo, en la coneja se producen oleadas de desarrollo y regresión folicular, en intervalos de 10 días aproximadamente (Hill, 1933), hasta que se produce la ovulación. Entre muchas otras, una de las funciones de la FSH es promover la secreción al torrente sanguíneo de estrógenos por parte de los folículos, lo cual está relacionado en la coneja con un periodo de aceptación de la monta. Este cambio suele ir acompañado de una coloración rojiza de la vulva y un cierto grado de turgencia de la misma, signos que nos permiten deducir que la hembra está receptiva y que se asocian con una mayor fertilidad (Gosálvez *et al.*, 1985; Maertens and Luzi, 1995).

En el momento en el que se produce la rotura del folículo y se libera el ovocito, la LH estimula el desarrollo de las células foliculares, produciéndose una transformación morfológica y funcionales de las células de la teca y la granulosa, dando lugar a la formación del cuerpo lúteo, responsable de la secreción de progesterona. La concentración de ésta aumenta gradualmente hasta alcanzar su punto máximo a mitad de la gestación, seguido de una disminución progresiva de la misma, llegando a los valores más bajos dos días antes del parto (Mikhail *et al.*, 1961).

1.1.4. *Transporte de gametos y desarrollo embrionario preimplantacional.*

Las primeras divisiones embrionarias, se producen en el oviducto, en el que podemos diferenciar distintas partes: el infundíbulo, que es la parte más cercana al ovario y está abierta a la cavidad abdominal, se encarga de recoger los ovocitos cuando la hembra ovula; el ampulla, es una porción secretora que se une al istmo mediante la unión ampulo-ístmica; y, por último, el istmo, que es una porción muscular con una luz que se estrecha respecto al ampulla; la unión que separa útero e istmo recibe el nombre de unión útero-tubárica (Norwood and Anderson, 1980; Menezo and Guerin, 1997). Pocos minutos después de la ovulación, los ovocitos son transportados hasta el ampulla medial, la región de la unión AT (ampulla-tubárica), donde serán fecundados (Osada *et al.*, 1999). A las 24 horas tras la inducción de la ovulación o del coito (p.c.), los embriones se encuentran en el istmo; en este momento se encuentran en estadio de 1-2 células (Renard *et al.*, 1982). A las 48 horas post-inducción empiezan a atravesar la unión útero-tubárica (Bourdage and Halbert, 1988). Durante su paso por el oviducto, se va formando la capa de mucina característica que pasa de medir 10 μm a las 24 horas p.c. a 100 μm a las 72 horas p.c. (López-Béjar, 1995). El estadio de mórula lo alcanzan aproximadamente a las 60 horas y, a las 72 horas ya se encuentran en fase de blastocisto temprano y empiezan a entrar en los cuernos uterinos, donde se pueden encontrar prácticamente la mayoría de ellos a las 84 horas (Hodgson and Pauerstein, 1976; Bourdage and Halbert, 1988; López, 1993). La implantación, que supone la distribución, adhesión y penetración del embrión en el epitelio uterino y

la invasión de los vasos del estroma (Lee and DeMayo, 2004), comienza entre los días 5 y 7 (Hoffman et al., 1998) y es posible gracias a la ausencia de contracciones provocada por el aumento de la progesterona y a la distensión que el propio blastocisto provoca (Torres, 1982).

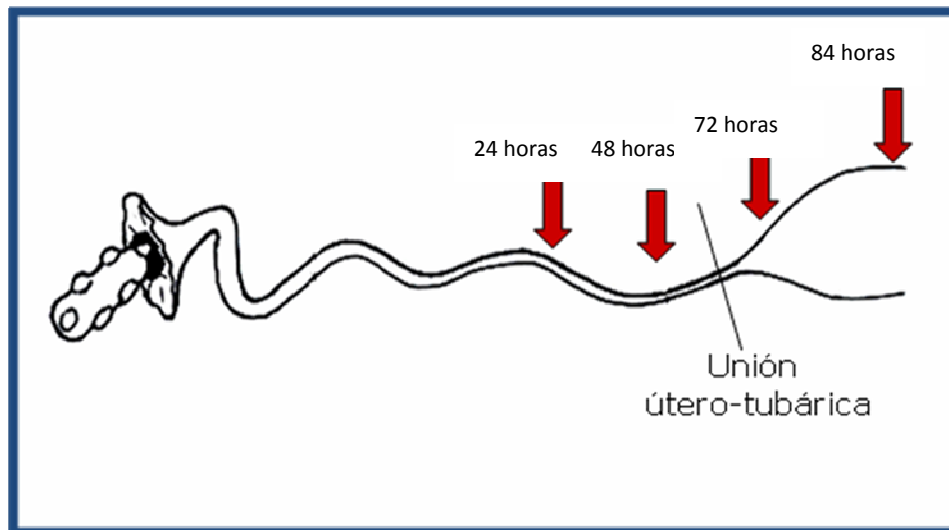


Figura 4. Figura esquemática de la progresión de los ovocitos a través del oviducto durante las primeras 84 horas,

Durante la ovulación, la actividad del ámpula aumenta (Osada *et al.*, 1999); esta contractibilidad está controlada por el sistema parasimpático: los receptores α , estimulados por los estrógenos que acompañan a la ovulación, aumentan la contractibilidad y los β , estimulados por la progesterona que aumenta tras la ovulación, la inhiben, relajando la unión y permitiendo, así, el transporte del ovocito (Osada *et al.*, 1999). De hecho, a las 24 horas de la ovulación, el espacio de tiempo entre las contracciones de la pared tubárica es mínimo y va aumentando hasta las 60-72 horas, seguramente debido a la acción de la progesterona (Fredericks *et al.*, 1982); del mismo modo, la amplitud de estas contracciones aumenta los días 1 y 1.5 para disminuir significativamente hasta el día 3 (Suzuki and Tsutsumi, 1981). Por otra parte, también el volumen de las secreciones tubáricas está controlado hormonalmente, de hecho, el estradiol provoca un aumento de las mismas, mientras que la progesterona hace que disminuyan (Menezo and Guerin, 1997).

Es necesario tener en cuenta que la duración o el funcionamiento de estos procesos, al estar controlados en gran medida por los niveles hormonales de la hembra, son sensibles a cambios en la producción de estas hormonas o a su ratio, ya que podrían interferir en el transporte normal del proceso de fecundación y consecuente desarrollo embrionario (Greve and Callesen, 2001). De este modo, un aumento del nivel de estrógenos en el momento de la inducción de la ovulación podría retrasar el transporte de los embriones, seguramente por una constricción prolongada de la luz del istmo (Eddy *et al.*, 1978), lo que podría asociarse a una menor recuperación de los embriones (Misra *et al.*, 1998). Por otra parte, parece que cuando la inducción de la ovulación se realiza mediante la inyección de hCG o GnRH, la entrada de los ovocitos o embriones al útero se acelera (Hodgson and Pauerstein, 1976; García-Ximenez and Vicente, 1992; López, 1993) y, del mismo modo, el transporte podría verse acelerado también en hembras sometidas a tratamientos de superovulación, seguramente por el aumento de relajación de la unión ampullo-tubárica debido al aumento de progesterona (Tsutsumi, 1980).

1.2. Tratamientos de superovulación

Debido a los elevados costes de las técnicas de recuperación de ovocitos y embriones y a las bajas eficiencias de determinadas técnicas a las que pueden destinarse éstos posteriormente, en numerosas ocasiones es conveniente someter a las hembras a tratamientos de superovulación para optimizar su rendimiento.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la administración de estos tratamientos resulta habitualmente en una disminución de la calidad de los ovocitos y embriones, ya que, en muchos casos, aumentan la tasa de gametos no fecundados, los fallos de ovulación o el número de folículos hemorrágicos (Fujimoto *et al.*, 1974; Renard *et al.*, 1982; Chrenek *et al.*, 1998; Kauffman *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2007b). Por otra parte, los resultados obtenidos tras la aplicación de estos tratamientos presentan una gran variabilidad ya que la respuesta

superovulatoria se puede ver afectada por el tipo de animal (raza o línea, individuo, edad, estado nutricional y fisiológico), el tipo de hormona empleado y el protocolo de administración.

1.2.1. Factores que afectan a los tratamientos de superovulación

1.2.1.1. Hembra (raza o línea e individuo)

Por un lado, se ha observado, tanto en conejos como en otras especies, que la línea con la que se trabaja tiene un impacto importante en la respuesta a los tratamientos de superovulación, tanto en términos de tasa de ovulación, como en la capacidad de desarrollo de los embriones obtenidos (Popova *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2007b).

Por otra parte, la respuesta de cada hembra es también extremadamente variable, ya que depende de diversos factores (Squires and McCue, 2007). De hecho, en el éxito de los tratamientos de superovulación influye tanto la genética de la donante como su edad o su estado de nutrición (Stroud and Hasler, 2006). En cuanto a la edad, no sólo influye en la disminución de respuesta al tratamiento de superovulación, sino que también aumenta la variabilidad de la misma (Popova *et al.*, 2005; Kagabu and Umezu, 2006).

Por último, el estado fisiológico de la hembra en el momento de la inducción de la superovulación condiciona también su respuesta. En ovino se ha observado que el número de folículos con capacidad de responder a la estimulación hormonal en el momento de inicio del tratamiento podría condicionar también la respuesta de la hembra (González-Bulnes *et al.*, 2003), seguramente debido a las diferencias de vascularización de los folículos y el estado de maduración del folículo/ovocito (Adriaenssens *et al.*, 2010), ya que no todos los ovocitos tienen capacidad de reanudar la meiosis (Bae and Foote, 1975). En conejo, mientras que el color de la vulva en el momento de la aplicación del tratamiento parece no poder predecir el resultado del mismo, el

estudio de la citología vaginal sí se ha podido relacionar tanto con la tasa de ovulación, como con la calidad de los embriones obtenidos (Tsiligianni *et al.*, 2004).

1.2.1.2. Tratamiento hormonal: pautas de tratamiento, efectos negativos y composición

Hormonas y pautas de tratamiento

La gran mayoría de tratamientos para la inducción de la superovulación se basan en la utilización de las hormonas eCG (gonadotropina coriónica equina) o FSH (hormona estimulante folicular).

La eCG es una glicoproteína producida en las células trofoblásticas endometriales de la yegua que tiene efecto FSH y LH. Su alto contenido en ácido siálico provoca su larga permanencia en sangre (Maertens and Luzi, 1995); esta característica permite su administración en una única dosis y, por tanto, minimizar la manipulación de los animales. En cambio, el contenido en ácido siálico de la FSH es menor y, por tanto, presenta una vida media corta (Rose *et al.*, 2000); de este modo, el protocolo de administración más frecuentemente utilizado ha sido el de la administración de dosis repetidas cada 12 horas durante 3 o 4 días (Kennelly and Foote, 1965; Joly, 1997; Kauffman *et al.*, 1998; Besenfelder, 2002; Salvetti *et al.*, 2007b).

Sin embargo, en los últimos años se han investigado otras alternativas a estas pautas de administración tanto para minimizar el estrés que puedan sufrir las hembras durante su manipulación; como para simplificar los protocolos utilizados.

En las tabla 1.1 y 1.2 se presentan los principales resultados obtenidos en diferentes trabajos de investigación en la estimulación de la superovulación en conejas tras la utilización de eCG y FSH, respectivamente.

Tabla 0.1. Resumen de diferentes protocolos de superovulación mediante el uso de eCG

Tratamiento	Autores	Dosis	IO	TO	ER	OR
eCG	(Kennelly and Foote, 1965)	6 x 12,5 UI	2,5 mg LH	16,6	-	13,7
	(Besenfelder, 2002)	120 UI	180 UI hCG	36,3	24,3	3,2
	(López-Béjar and López-Gatius, 2002)	80 UI	30 UI hCG	-	17,8	-
	(Tsiligianni <i>et al.</i> , 2004)	20 UI/kg	120 UI hCG	28,7	14,2	-
	(Mehaisen <i>et al.</i> , 2005)	50 UI	-	15,2	10,09	-
	(Mehaisen <i>et al.</i> , 2005)	200 UI	-	19,1	8,8	-
	(Mehaisen <i>et al.</i> , 2006)	20 UI/kg	75UI hCG	19,2	15,4	-

Modificado de Mehaisen (2005), siendo: IO, inducción de la ovulación; TO, tasa de ovulación, ER, embriones recuperados y OR, ovocitos recuperados

Una de estas alternativas es la utilización de macromoléculas como vehículo de la FSH. Así, el gel de hidróxido de aluminio se ha utilizado tanto en conejos (Hashimoto *et al.*, 2007) como en vacuno (Kimura *et al.*, 2007) y, si bien los resultados parecen ser buenos, convendría corroborarlos con un número de individuos mayor. Mientras que existe un mayor número de trabajos en los que se ha utilizado la Polivinilpirrolidona (PVP) tanto en conejos (Kanayama *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007b; Salvetti, 2008) como en otras especies con resultados variables (D'Alessandro *et al.*, 2001; Lopes da Costa *et al.*, 2001). Esta molécula, es un polímero sintético de la vinilpirrolidona que presenta solubilidad universal y actúa como un surfactante no iónico. Dos de sus principales características que hacen su uso interesante son su gran compatibilidad biológica y su baja toxicidad. Produce unas soluciones más o menos viscosas en función de su concentración, su

peso molecular, y de la forma y tamaño del polímero (Buhler, 2005), características que parecen afectar también al resultado de los tratamientos de superovulación (D'Alessandro *et al.*, 2001).

Tabla 0.2. Resumen de diferentes protocolos de superovulación mediante el uso de FSH

Tratamiento	Autores	Dosis	IO	TO	ER	OR
FSH	(Kennelly and Foote, 1965)	6 x 0,155 mg	2,5 mg LH	56,1	-	40,4
	(Joly, 1997)	5 x 0,4mg / 12h(s.c.)	0,2 ml GnRH	32	30,4	-
	(Kauffman <i>et al.</i> , 1998)	6 x 0,5 mg / 12h	150 UI hCG	26,5	21,3	19,4
	(Kauffman <i>et al.</i> , 1998)	8 x 0,5 mg / 12h	150 UI hCG	23,5	14,9	23,5
	(Cheng <i>et al.</i> , 1999)	6 x 0.3 mg / 12 h	25 UI hCG	28	-	-
	(Besenfelder, 2002)	6 x 2,25 mg / 12h	180 UI hCG	43	27,1	8,1
	(Mehaisen <i>et al.</i> , 2006)	3 x 0.6 mg / 24 h	75UI hCG	25,2	20,3	-
	(Salveti <i>et al.</i> , 2007b)	5 x 9µg /ml /12h	1,6 µg Buserelina	26,7	21,2	-
	(Salveti <i>et al.</i> , 2007b)	5 x 9µg /ml + 20% LH / 12h	1,6 µg Buserelina	27,1	20,3	-
	Salveti, 2008	5 x 9µg /ml + 20% LH / 12h	1,6 µg Buserelina	38,1	32,2	-
	Salveti 2008	1 x 31.5 µg	1,6 µg Buserelina	28	17,2	-

Modificado de Mehaisen (2005), siendo: IO, inducción de la ovulación; T, tasa de ovulación, ER, embriones recuperados y OR, ovocitos recuperados. * son aquellos tratamientos en los que las dosis varían en función del momento de inyección

Efectos negativos de los tratamientos de superovulación

Tal y como se ha comentado previamente, los tratamientos de superovulación pueden alterar la calidad de los ovocitos y embriones recuperados.

Entre otras consecuencias, la administración de gonadotropinas externas puede resultar en una modificación de la concentración de esteroides circulantes (Donoghue *et al.*, 1992) y de la proporción de β -estradiol y progesterona. Los niveles de estas hormonas en el momento de inseminación y concepción son de crucial importancia en estos dos procesos, ya que son los responsables, entre otros, del correcto ambiente oviductal y uterino, así como de la sincronización que ha de existir entre el embrión y el endometrio en el momento de la implantación (Greve and Callesen, 2001) influyendo tanto en la tasa de ovulación obtenida tras el tratamiento como en el número de embriones recuperados (González-Bulnes *et al.*, 2003). De hecho, los cambios en la expresión génica inducidos por las hormonas ováricas, especialmente por la progesterona, son críticos para la implantación y el mantenimiento de la gestación (Lee and DeMayo, 2004).

Por otra parte, los tratamientos de estimulación ovárica podrían provocar el reclutamiento de ovocitos que no han podido completar la diferenciación apropiadamente (Sirard *et al.*, 2006). Así, parece que se pueden apreciar cambios en los patrones de maduración de los ovocitos incluso sin percibir un cambio en los niveles de estradiol en sangre (García-García *et al.*, 2009), aun con dosis inferiores a las utilizadas habitualmente para superovular.

De hecho, se ha observado que el tratamiento con eCG puede resultar en una disminución de la tasa de ovocitos liberados en el estadio esperado (Chrenek *et al.*, 1998; Tain *et al.*, 2000), una alteración en la organización de determinados orgánulos ovocitarios (Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006a), en fallos de fertilización de los ovocitos (Lee *et al.*, 2005), en una menor tasa de desarrollo de los embriones (Sengoku and Dukelow, 1988; Ertzeid and Storeng, 2001) o un retraso del mismo (Van der Auwera and D'Hooghe, 2001); en una mayor mortalidad post-implantación de los embriones (Ertzeid y Storeng, 2001), un retraso en el crecimiento fetal (Van der Auwera y D'Hooghe, 2001), un aumento de la reabsorción embrionaria (Van der Auwera and D'Hooghe, 2001), en un aumento de las anormalidades cromosómicas (Fujimoto *et al.*, 1974) o en un aumento de la sensibilidad a la criopreservación (Mehaisen *et al.*, 2005). Además, parece que los efectos negativos de la

administración de eCG son dependientes de la dosis (Lee *et al.*, 2005; Mehaisen, 2005; Yu *et al.*, 2010; Maertens and Luzi, 1995).

Por otra parte, la FSH también se ha asociado con una disminución de la calidad de los ovocitos o embriones obtenidos, ya que se han descrito efectos tras su aplicación, como un aumento de los folículos anovulatorios (Guthrie *et al.*, 1997) y hemorrágicos (Salveti *et al.*, 2007b), un aumento de los fallos de fecundación (Salveti *et al.*, 2007b), una disminución en la tasa de desarrollo de los embriones (Mehaisen *et al.*, 2005), así como diferencias en las tasas de maduración in vitro (Cocero *et al.*, 2011), mayor sensibilidad a la crioconservación (Mehaisen *et al.*, 2005), o una disminución en el número de nacidos vivos tras la crioconservación de los embriones obtenidos (Kauffman *et al.*, 1998). Estos efectos también parecen estar relacionados con la dosis aplicada (Stenbak *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2005).

En cualquier caso, parece ser que los efectos negativos de la eCG son mayores que los de la FSH (Armstrong and Opavsky, 1988; Lopes da Costa *et al.*, 2001; Mehaisen *et al.*, 2005), seguramente, debido a la persistencia en sangre de la eCG y, por tanto, de sus efectos.

Composición del tratamiento

Además de la dosis, otro de los factores que interviene en los resultados de los tratamientos de superovulación es la composición de los productos utilizados para superovular. De hecho, una de las causas de la gran variabilidad en la respuesta al tratamiento con eCG podría radicar en las diferencias de composición de los lotes utilizados (Aggarwal *et al.*, 1980).

En el caso de la FSH, tradicionalmente se han utilizado preparados de extractos hipofisarios relativamente indefinidos, cuya composición entre lotes es variable y con una cantidad desconocida de LH, lo cual provoca que la proporción FSH/LH que hay en los preparados comerciales no siempre

sea constante. Éste sería un hecho que contribuiría también a la gran variabilidad en los resultados de los tratamientos de superovulación.

Si bien, parece claro que el nivel de FSH administrado debe estar en un determinado rango para evitar posibles efectos adversos (Rose *et al.*, 2000), ya que existe un periodo en el cual cada folículo es sensible a la FSH (Hillier, 2009); parece que los efectos de un exceso de LH podrían tener también un efecto negativo sobre la calidad ovocitaria; de hecho, en los últimos años se han desarrollado numerosos trabajos para valorar su impacto (Rosas *et al.*, 1998; Lopes da Costa *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007b; Squires and McCue, 2007). Los resultados obtenidos parecen indicar que un exceso de LH podría resultar en detrimento de la calidad ovocitaria, debido a una maduración prematura o a una desviación de los perfiles endocrinos, normalmente un desequilibrio entre progesterona y β -estradiol (Greve and Callesen, 2001; Squires and McCue, 2007), lo que además, podría provocar también alteraciones en el transporte de los gametos (Greve and Callesen, 2001), una activación precoz de los ovocitos (Levi-Setti *et al.*, 2006), la luteinización de los folículos o una ovulación prematura (Squires and McCue, 2007) o un mayor número de folículos anovulatorios (González-Bulnes *et al.*, 2000). Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados, el efecto de la LH en los tratamientos de superovulación sigue sin esclarecerse de forma definitiva.

Una posibilidad para el estudio del efecto de esta hormona es la obtención de extractos altamente purificados (Rosas *et al.*, 1998; Squires and McCue, 2007) con una proporción de LH conocida, ya que la actividad LH de estos compuestos se ve reducida significativamente (Armstrong and Opavsky, 1988). Al comparar diferentes concentraciones de LH, se ha observado un efecto sobre la tasa de ovulación obtenida (Armstrong and Opavsky, 1988), sobre el número de hembras que responden a la inducción de la superovulación (Lopes da Costa *et al.*, 2001) y sobre la calidad de los ovocitos o embriones obtenidos (Rosas *et al.*, 1998; Squires and McCue, 2007). En conejos, se ha estudiado el efecto de la proporción de LH en los tratamientos de superovulación mediante la

utilización de FSH porcina purificada con diferente proporción de LH (Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007b) sin encontrar diferencias ni en la tasa de ovulación, ni en la tasa de desarrollo de los embriones *in vivo* o *in vitro* (Salvetti *et al.*, 2007b).

Sin embargo, recientemente, la utilización de FSH obtenida a través de la tecnología de ADN recombinante ha supuesto otra posible solución, ya que se trata de un producto con un grado de pureza absoluto y sin contaminación de LH con una homogeneidad lote a lote de la que no disponen los preparados actuales de extractos hipofisarios. La rhFSH ha sido utilizada con resultados variables en ratón (Edwards *et al.*, 2005), vaca (Takagi *et al.*, 2001) o monos (Yang *et al.*, 2008).

Repetición de tratamientos de superovulación sobre una misma hembra.

En muchas ocasiones, debido al gran valor genético de muchas de las hembras que son sometidas a procesos de superovulación y recuperación de ovocitos o embriones, resulta especialmente interesante la repetición de estos tratamientos sobre el mismo animal (Medjdoub, 2000; Forcada and López, 2000; Mehaisen *et al.*, 2004). Sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que, cuando la superovulación se induce en más de una ocasión en una misma hembra, la respuesta al tratamiento, así como la calidad de los gametos o la prolificidad (Maertens and Luzi, 1995) se puede ver reducida tanto en conejos (Renard *et al.*, 1982; Mehaisen *et al.*, 2006), como en otras especies como el ratón (Van Blerkom and Davis, 2001; Combelles and Albertini, 2003), el gato (Swanson *et al.*, 1996) o el mono (Yang *et al.*, 2008); aunque no siempre la utilización de tratamientos repetidos de superovulación se han correspondido con una disminución de la tasa de ovulación o de la fertilidad (Roy *et al.*, 1999; Caligara *et al.*, 2001). Una de las posibles causas de esta disminución de la respuesta podría ser la generación de anticuerpos frente a las hormonas administradas, como es el caso de eCG, incluso administrada en bajas dosis (Boiti *et al.*, 1995; Swanson *et al.*, 1996; Lebas *et al.*, 1996). Esto explicaría el aumento de la tasa de anticuerpos anti-FSH descrito en mujeres con problemas de infertilidad (Haller *et al.*, 2007) y una relación entre el

aumento de anticuerpos anti-FSH en sangre y un aumento de la FSH circulante en sangre (Haller *et al.*, 2007). Además, mientras un mayor número de tratamientos provocaría una mayor respuesta inmunitaria (Bourdillon *et al.*, 1992; Lebas *et al.*, 1996), la alternancia de tratamientos con distintas hormonas (Maurer *et al.*, 1968; Mehaisen *et al.*, 2006) o el incremento de los tiempos entre diferentes tratamientos (Maertens and Luzi, 1995; Swanson *et al.*, 1996; Kanayama and Osada, 2000) podrían reducir el impacto de la repetición de los mismos.

1.3. Recuperación de ovocitos y embriones

Existen diferentes procedimientos para llevar a cabo una recuperación de ovocitos y embriones. La elección de uno u otro depende, en gran medida, de los recursos disponibles, del valor genético de la hembra utilizada y de los objetivos de la recuperación.

1.3.1. Métodos de recuperación de embriones

Las primeras recuperaciones de embriones de conejo que se realizaron fueron *post-mortem*, mediante el lavado oviductal (Maurer and Haseman, 1976; Parrish and Foote, 1986). Hoy en día sigue siendo la práctica más habitual cuando las hembras donantes no tienen un valor particular (Joly *et al.*, 1996; Vicente *et al.*, 2003; García *et al.*, 2003a ; Tsiligianni *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2007b).

Sin embargo, las recuperaciones *in vivo* suponen una gran ventaja, especialmente en aquellas poblaciones en que los animales tienen un valor añadido, así, se empezaron a practicar recuperaciones de embriones mediante laparotomías (Kasai *et al.*, 1992; López, 1993; Kauffman *et al.*, 1998; Medjdoub, 2000). De hecho, se han llegado a realizar laparotomías repetidas para recuperar embriones de 65-66 horas hasta en cuatro ocasiones sobre la misma coneja (Forcada and López, 2000).



Imagen 1. Perfusión del oviducto y cuerno uterino tras su resección mediante laparotomía

Sin embargo, las recuperaciones *in vivo* suponen una gran ventaja, especialmente en aquellas poblaciones en que los animales tienen un valor añadido, así, se empezaron a practicar recuperaciones de embriones mediante laparotomías (Kasai *et al.*, 1992; López, 1993; Kauffman *et al.*, 1998; Medjdoub, 2000). De hecho, se han llegado a realizar laparotomías repetidas para recuperar embriones de 65-66 horas hasta en cuatro ocasiones sobre la misma coneja (Forcada and López, 2000).

Otra técnica de recuperación *in vivo* menos invasiva es la recuperación por laparoscopia; utilizada anteriormente para el recuento de cuerpos lúteos y de embriones (Santacreu *et al.*, 1990). Desde que se empezara a utilizar para la recuperación de embriones (Besenfelder *et al.*, 1998) se ha realizado en repetidas ocasiones (Lavara *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006), ya que permite realizar la recuperación con la mínima invasión quirúrgica, minimizando, así, el riesgo de infecciones, adherencias y, por tanto, de efectos negativos sobre la hembra.

El momento idóneo de recuperación de los embriones está en función del objetivo para el que se recuperan éstos: en el caso de que se recuperen para su posterior congelación o vitrificación, los mejores resultados en conejo se obtienen cuando se recupera en estadio de mórula o blastocisto (Maurer and Haseman, 1976; Vicente *et al.*, 2003). En cambio, en caso de destinar esos embriones a

transgénesis, la recuperación se realizará en estadio de pronúcleo, a las 18-19 horas (Chrenek *et al.*, 1998; Tsiligianni *et al.*, 2004).



Imagen 2. Método de recuperación de embriones y /o ovocitos por laparoscopia

El momento idóneo de recuperación de los embriones está en función del objetivo para el que se recuperan éstos: en el caso de que se recuperen para su posterior congelación o vitrificación, los mejores resultados en conejo se obtienen cuando se recupera en estadio de mórula o blastocisto (Maurer and Haseman, 1976; Vicente *et al.*, 2003). En cambio, en caso de destinar esos embriones a transgénesis, la recuperación se realizará en estadio de pronúcleo, a las 18-19 horas (Chrenek *et al.*, 1998; Tsiligianni *et al.*, 2004).

1.3.2. Métodos de recuperación de ovocitos

En el caso de los ovocitos, la recuperación de los mismos puede realizarse en estadio de vesícula germinal, en cuyo caso habría que madurarlos *in vitro* posteriormente o bien en estadio de metafase II.

Métodos de recuperación de ovocitos inmaduros

Los métodos tradicionales de recuperar ovocitos de conejo han sido los de aspiración folicular (Lorenzo *et al.*, 1996; Bae and Foote, 1980; Kanaya *et al.*, 2007) y/o los de corte folicular (“slicing”) (Lorenzo *et al.*, 1997; Illera *et al.*, 1997). La eficiencia de recuperación de ambos métodos es similar (Lorenzo *et al.*, 1996).

En alguna ocasión se ha dado la recuperación *in vivo* de ovocitos inmaduros por aspiración folicular guiada por laparoscopia y por laparotomía, entre las 9 y 10 horas tras la inyección de hCG, justo antes de la ovulación (Asakawa *et al.*, 1988), pero es una técnica muy poco utilizada.

Métodos de recuperación de ovocitos maduros

La técnica habitualmente utilizada es la del lavado ovidutal *post-mortem*, usualmente realizada entre las 14 y las 16h tras inducir la ovulación (Zeng *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007b).

La recuperación *in vivo* de ovocitos es bastante inusual. Una práctica muy poco frecuente ha sido la obtención de los mismos mediante la extirpación de los ovarios de la hembra (Seitz *et al.*, 1970). En otras ocasiones, las recuperaciones se han realizado mediante el lavado de los oviductos por laparotomía (Maurer *et al.*, 1968; Yang *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2004). Por último, aunque con muy poca frecuencia, la recuperación de ovocitos también se ha realizado en alguna ocasión por laparoscopia (Besenfelder *et al.*, 2000).

1.4. Crioconservación de ovocitos y embriones

La crioconservación celular tiene como objetivo almacenar de forma viable las células durante largos periodos de tiempo. El desarrollo de métodos eficaces de conservación permiten de un lado salvaguardar la célula de su posible contaminación biológica preservando su valor genético, y de otro lado, disocia el momento de su obtención del momento de su utilización, favoreciendo su difusión. Las técnicas de crioconservación reducen o anulan la actividad metabólica de la célula mediante el descenso de temperatura, permitiendo así su almacenamiento (Lavara *et al.*, 2011). Sin embargo, este proceso provoca un cambio de las características biofísicas del medio intracelular, cuyos principales efectos son la deshidratación celular (efecto solución) y la formación de hielo intracelular, lo que provoca una modificación tanto la estructura de las membranas celulares como la conformación de las enzimas que afecta a la supervivencia celular. Por otra parte, el éxito de la crioconservación es variable y está en función de diferentes factores, como el protocolo seleccionado, el tipo de crioprotector utilizado, la especie con la que se trabaje, el origen de los gametos o su estadio de desarrollo.

1.4.1. Factores que afectan a la crioconservación

1.4.1.1. Procedimiento

Los procedimientos de crioconservación de células animales se diferencian, en función de su velocidad de ejecución y de la formación o no de hielo intracelular y extracelular, en protocolos lentos de congelación (de 0.3 a $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$), ultracongelación ($>-500^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y vitrificación ($>-500^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sin formación de hielo). En ovocitos y embriones de diferentes especies ganaderas se han definido con éxito diversos protocolos tanto lentos (congelación) como rápidos (vitrificación).

Congelación

En estos procedimientos se pueden definir varias fases (enfriamiento, superenfriamiento, equilibrio y congelación), que pueden ser controladas de modo independiente, por lo que requieren la utilización de dispositivos para controlar la temperatura. El objetivo es alcanzar el equilibrio entre los diferentes factores causantes del daño celular, como son la formación de cristales de hielo intracelular (daños mecánicos y daños asociados a las variaciones en la concentración de los solutos intra y extracelulares), además de la respuesta de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos al descenso de la temperatura, lo que conlleva, la alteración de los orgánulos intracelulares y de las uniones entre células (Vajta, 2000; Vajta and Kuwayama, 2006; Prentice and Anzar, 2011). Este equilibrio se consigue a través del intercambio de soluciones entre el medio intra y extracelular y el mayor nivel de éxito se consigue cuando la velocidad de enfriamiento permite un equilibrio entre la ratio de deshidratación de la célula y la ratio en la que el agua se incorpora a los cristales extracelulares (Shaw and Jones, 2003).

El proceso consiste en el enfriamiento de los ovocitos o embriones desde la temperatura ambiente hasta los -5 o -7 °C aproximadamente (fase de enfriamiento), donde el medio se encuentra por encima de su punto de congelación (fase de superenfriamiento), permaneciendo el medio en estado líquido, pudiéndose inducir el cambio de estado de forma controlada. En la mayoría de los protocolos de congelación se induce el cambio de estado a temperaturas cercanas a -6 °C para evitar riesgos de un excesivo superenfriamiento de la muestra. El cambio de estado lleva asociada una liberación de calor latente de fusión, lo que provoca un aumento de la temperatura que hace que se modifique el equilibrio osmótico entre el medio intra y extracelular. Por lo que tras el cambio de estado se mantiene la temperatura durante unos minutos para que se restablezca el volumen celular (fase de equilibrio). Posteriormente, se inicia la fase de congelación a unos 0.3 a -1 °C/minuto hasta alcanzar una temperatura de entre -30 y -80 °C (dependiendo del protocolo utilizado), momento en el que se sumergen en el nitrógeno líquido.

Vitrificación

Este procedimiento rápido de crioconservación evita la formación de hielo intra y extracelular, consiste en la exposición de gametos y embriones a soluciones crioprotectoras que forman un sólido vítreo tras su inmersión en nitrógeno líquido, favoreciendo la disminución del daño por rotura dada la ausencia de cristales de hielo. El estado vítreo mantiene la distribución espacial molecular e iónica del estado líquido, por lo que se puede considerar como un líquido extremadamente denso y superenfriado.

En general, en las soluciones utilizadas para vitrificar, la mezcla de crioprotectores supone entre el 40 y el 60% del volumen total. Para poder disminuir la concentración de crioprotectores, hay que aumentar la velocidad de enfriamiento, lo que se puede conseguir disminuyendo el volumen de medio en el que se depositan los ovocitos o embriones mediante la utilización de diferentes soportes (Vajta, 2000; Vajta and Kuwayama, 2006). De hecho, la probabilidad de vitrificación viene definida como (Saragusty and Arav, 2011):

$$\text{Probabilidad de vitrificación} = \frac{\text{Velocidad de enfriamiento} \times \text{viscosidad}}{\text{Volumen}}$$

La elección de un procedimiento de crioconservación de ovocitos y embriones dependerá de cada laboratorio, ya que ambos procedimientos presentan ventajas e inconvenientes (Tabla 1.3); en cualquier caso el futuro de la vitrificación podría pasar no por reemplazar a la congelación, sino por ofrecer soluciones en casos especiales donde otros métodos no han funcionado (Vajta, 2000).

Tabla 0.3. Ventajas e inconvenientes de los procesos de congelación y vitrificación

	CONGELACIÓN	VITRIFICACIÓN
COSTES	Elevado, pues requiere de un equipo de control de temperatura	No requiere de ningún equipo especial
TIEMPO	Proceso más largo que el de vitrificación, ya que hay que respetar los tiempos y las rampas de temperatura	El proceso es mucho más corto, sin embargo, si el número de muestras es elevado, puede aumentar ya que cada pajueta se trata individualmente*
RESULTADOS Y REPETIBILIDAD	Si bien los resultados no superan a los de la vitrificación, los protocolos son más estandarizados**	Habitualmente, se obtienen mejores resultados, especialmente en la crioconservación de ovocitos***

* (Shaw and Jones, 2003); *** (Van der Elst, 2003); ** (Vajta and Kuwayama, 2006)

1.4.1.2. Crioprotectores

Para reducir los daños causados a la célula por el proceso de crioconservación, es necesaria la incorporación de un agente crioprotector en el medio de congelación. De hecho, la adición de los crioprotectores permite disminuir la temperatura a la cual empieza la nucleación, es decir, la formación de cristales, llegando a poderse evitar de forma absoluta en el caso de la vitrificación (Shaw and Jones, 2003).

Estos agentes, en función de dónde ejercen sus efectos, se pueden clasificar como intracelulares o permeables, o bien extracelulares o impermeables.

Los crioprotectores permeables reducen los daños causados por el efecto solución como los derivados de la formación de cristales. Son moléculas de bajo peso molecular que actúan penetrando en las células; permitiendo así disminuir el punto de congelación y sustituyendo al agua alrededor y dentro de las proteínas, ADN y otros compuestos intracelulares (Shaw and Jones, 2003). Pese a su

efecto favorable, estas sustancias pueden tener efectos nocivos, ya que pueden causar un shock osmótico (especialmente en altas concentraciones) y suelen resultar tóxicos para las células. Esta toxicidad se presenta en mayor o menor medida en función del peso molecular y de la temperatura a la que son aplicados estos agentes (Massip, 2001), así como del tiempo de exposición de los embriones al medio (Kasai *et al.*, 1992); de hecho, se ha observado un mayor efecto perjudicial en la exposición de embriones a una solución con un 30% de crioprotector durante 10 minutos, frente a una del 40% durante dos minutos (Hochi *et al.*, 2004). Pero no sólo la adición correcta del crioprotector es importante, la eliminación del mismo es también imprescindible cuando se descongela o desvitrifica una célula, por tanto, la velocidad de descongelación o desvitrificación también debe ser la adecuada (Shaw and Jones, 2003).

Inicialmente, los crioprotectores intracelulares más utilizados eran el dimetilsulfóxido, el glicerol y el propilenglicol (Miyake *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha asociado la utilización de estos agentes con efectos tóxicos, como anormalidades cromosómicas o inducción de partenogénesis en el caso de los ovocitos (Van der Elst, 2003; Shaw and Jones, 2003); de este modo, cada vez es más frecuente el uso de etilenglicol, ya que su bajo peso molecular facilitaría su velocidad de penetración y, por tanto, disminuiría el tiempo de exposición y, así, su efecto tóxico (Saha *et al.*, 1996); de hecho, se ha comprobado su baja toxicidad en concentraciones entre 1.8 y 3.6 M (Sommerfeld and Niemann, 1999).

Por otra parte, la combinación de diferentes crioprotectores, la adición de los mismos por pasos o el preenfriamiento de las soluciones permite disminuir la cantidad aplicada de cada uno y, por tanto, sus efectos tóxicos (Vajta, 2000; Vajta and Kuwayama, 2006).

En cuanto a los crioprotectores no permeables, acostumbran a ser moléculas de alto peso molecular que actúan extrayendo el agua libre intracelular gracias a la diferencia de presión osmótica que provocan en la solución (Sommerfeld and Niemann, 1999). Por otra parte, los

polímeros de alto peso molecular pueden mejorar las propiedades de vitrificación del medio mediante la protección de membranas, la protección frente a las roturas o el bloqueo de la formación de los cristales de hielo en el caso de los llamados bloqueadores de hielo (Wowk *et al.*, 2000) y promoviendo el proceso de vitrificación, ya que aumentan la viscosidad (Fahy *et al.*, 1984). De hecho, algunos de ellos se empezaron a utilizar como sustitutos de proteínas o de otros crioprotectores, con resultados variables (Shaw and Jones, 2003).

Los crioprotectores extracelulares más utilizados son: la glucosa, la fructosa, el dextrano, el sorbitol, la sacarosa, la lactosa, trehalosa, rafinosa y otros azúcares (Kuleshova *et al.*, 1999). Respecto a las macromoléculas y bloqueadores de hielo, algunos de los más estudiados han sido el polivinilalcohol (PVA) (Wowk *et al.*, 2000; Checure and Seidel, 2007), la polivinilpirrolidona (PVP), el ficol, o el dextrano (Shaw *et al.*, 1997).

Por último, como se ha señalado con anterioridad, la concentración de crioprotectores varía ostensiblemente en función de la técnica escogida: vitrificación o congelación. De hecho, en la congelación suelen utilizarse concentraciones de entre 1 y 2 M, frente a los 5 y 7 M utilizados en la vitrificación (Vajta, 2000), gracias, al aumento de la velocidad de enfriamiento aplicado con esta última técnica.

1.4.1.3. Otros factores

Pero no sólo los factores citados anteriormente influyen en el éxito o no del proceso, hay otros muchos relacionados de gran importancia. En la tabla 1.4 se resumen los mismos.

Tabla 0.4. Principales factores que afectan al éxito del proceso de crioconservación

FACTORES QUE AFECTAN AL ÉXITO DE LOS PROCESOS DE CRIOCONSERVACIÓN									
Especie	Ratio entre colesterol y fosfolípidos de las membranas y cantidad de lípidos citoplasmáticos (Seidel et al., 2006, Prentice y Anzar, 2011)								
	Sensibilidad especial a daños en mitocondria y uniones GAP entre el ovocito y las células de la corona radiata en determinadas especies (Hochi et al., 1996) Daño en enzimas relacionados con la maduración en determinadas especies (Bogliolo et al., 2007).								
Estadio de desarrollo	OVOCITOS								
	<table border="1"> <tr> <td>Ovocitos en metafase II</td> <td>Ovocitos en vesícula germinal</td> </tr> <tr> <td>Mayor sensibilidad a sufrir daños en cromosomas y microtúbulos (Van der Elst, 2003; Saragusty and Arav, 2011)</td> <td>Requiere la conservación de la integridad tanto del ovocito en sí como de las células del cúmulo (Bogliolo et al., 2007)</td> </tr> <tr> <td>Menor coeficiente de permeabilidad de la membrana (Ruffing et al., 1993)</td> <td>Mayor dificultad en la penetración de los crioprotectores por las células del cúmulo (Vajta, 2000)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Requiere maduración in vitro posterior, disminuyendo la eficiencia global del proceso (Van der Elst, 2003; Shaw et al., 2000; Mandelbaum et al., 2004)</td> </tr> </table>	Ovocitos en metafase II	Ovocitos en vesícula germinal	Mayor sensibilidad a sufrir daños en cromosomas y microtúbulos (Van der Elst, 2003; Saragusty and Arav, 2011)	Requiere la conservación de la integridad tanto del ovocito en sí como de las células del cúmulo (Bogliolo et al., 2007)	Menor coeficiente de permeabilidad de la membrana (Ruffing et al., 1993)	Mayor dificultad en la penetración de los crioprotectores por las células del cúmulo (Vajta, 2000)		Requiere maduración in vitro posterior, disminuyendo la eficiencia global del proceso (Van der Elst, 2003; Shaw et al., 2000; Mandelbaum et al., 2004)
	Ovocitos en metafase II	Ovocitos en vesícula germinal							
Mayor sensibilidad a sufrir daños en cromosomas y microtúbulos (Van der Elst, 2003; Saragusty and Arav, 2011)	Requiere la conservación de la integridad tanto del ovocito en sí como de las células del cúmulo (Bogliolo et al., 2007)								
Menor coeficiente de permeabilidad de la membrana (Ruffing et al., 1993)	Mayor dificultad en la penetración de los crioprotectores por las células del cúmulo (Vajta, 2000)								
	Requiere maduración in vitro posterior, disminuyendo la eficiencia global del proceso (Van der Elst, 2003; Shaw et al., 2000; Mandelbaum et al., 2004)								
EMBRIONES									
	Momento óptimo de crioconservación entre el estadio de mórula compacta y el de blastocisto (Sommerfeld and Niemann, 1999; Lin et al., 2011)								
Medio de cultivo	Modificación de membranas, así como del contenido lipídico de las células, alterando su sensibilidad a la congelación (Massip, 2001; Seidel, 2006)								
Origen	Recuperación in vivo o post-mortem puede afectar a la calidad (Tucker et al., 2004)								
	Superovulación previa puede influir en el resultado de la crioconservación (Kauffman et al., 1998; Mehaisen et al., 2006)								

1.4.2. Criopreservación de ovocitos frente a criopreservación de embriones

El caso de los embriones es diferente al de los ovocitos, ya que las características de sus membranas les confieren mayor permeabilidad (Gook *et al.*, 1993) y su tolerancia osmótica aumenta (Prentice and Anzar, 2011); es por ello que los métodos que se usan con éxito en la criopreservación de embriones no pueden extrapolarse tal cual a los ovocitos (Chen *et al.*, 2003).

De hecho, si bien, la criopreservación de embriones es un proceso altamente estandarizado con unos resultados considerados aceptables en la mayoría de especies, no ocurre lo mismo con los ovocitos. Los motivos de esta diferencia son varios, aunque entre los más importantes destacan la diferencia de tamaño entre los ovocitos y las células de los embriones, que implica un aumento de la ratio superficie: volumen, dificultándose así el movimiento de agua y crioprotectores a través de sus membranas; la variación en la permeabilidad de las membranas, así como la presencia de la zona pelúcida, una barrera más para los crioprotectores y la presencia de diferentes estructuras especialmente sensibles a la criopreservación, como son los gránulos corticales y el huso meiótico (Leibo, 1977; Chen *et al.*, 2003).

Así, se han descrito numerosos efectos negativos de la criopreservación sobre los ovocitos. Algunos de ellos son:

- ✓ Liberación prematura del contenido de los gránulos impidiendo, así, la posterior fecundación (Prentice and Anzar, 2011).
- ✓ Afectación del huso meiótico, dificultando la correcta extrusión del corpúsculo polar (Mandelbaum *et al.*, 2004) y pudiendo provocare problemas de poliploidía y daño en el ADN (Bouquet *et al.*, 1993).
- ✓ Alteración del citoesqueleto, afectando así a la división normal de las células (Gardner *et al.*, 2007)

- ✓ Efecto sobre la actividad metabólica, como su capacidad de regular el flujo de Ca y la polaridad de la mitocondria (Jones *et al.*, 2004).

En cualquier caso, si bien no existe ningún procedimiento de crioconservación de ovocitos estandarizado (Prentice and Anzar, 2011), parece claro que, como se ha apuntado previamente, estos efectos se minimizarían si se aplicaran técnicas de vitrificación en lugar de las de congelación (Gardner *et al.*, 2007; Salvetti *et al.*, 2007b).

1.4.3. *El caso del conejo. Crioconservación de embriones*

Como se ha comentado anteriormente, el estadio óptimo para la crioconservación de embriones de conejo es el de mórula compacta o blastocito (Lin *et al.*, 2011).

Para la congelación lenta de los embriones de conejo, los protocolos utilizados han sido bastante homogéneos y se han basado principalmente en la utilización de DMSO como principal crioprotector (Vicente and García-Ximénez, 1993; Joly, 1997; Naik *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2007a). En cambio, desde los primeros trabajos de vitrificación (Smorag *et al.*, 1989; Kobayashi *et al.*, 1990), los protocolos se han ido modificando, tanto en lo referente a los medios y crioprotectores (Kasai *et al.*, 1992; Vicente and García-Ximénez, 1994; Kauffman *et al.*, 1998; Papis *et al.*, 2005; Mehaisen, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006), como en lo referente a los soportes utilizados (López-Béjar and López-Gatius, 2002; Naik *et al.*, 2005).

En este contexto, es imprescindible tener en cuenta que uno de los factores importantes cuando se trabaja en la crioconservación de embriones y ovocitos es el modo en que se puede valorar su eficacia, especialmente en estos últimos.

En la tabla 1.5, se presenta un resumen de los principales resultados obtenidos con diferentes protocolos.

Tabla 0.5. Resumen de diferentes protocolos de crioconservación en función del crioprotector utilizado

	Autores	Crioprotector	Desarrollo <i>in vitro</i>	Desarrollo <i>in vivo</i> ***
Congelación	Vicente and García-Ximenez, 1993	1.5 M DMSO	-	32%
	(Vicente and García-Ximenez, 1994)	1.5 M DMSO (Vicente and García-Ximenez, 1994)	73.8%	-
	(Joly, 1997)	1.5 M DMSO	63%**	41%
	(Naik <i>et al.</i> , 2005)	1.5 M DMSO	55%**	19%
	(Salveti <i>et al.</i> , 2007b)	1.5 M DMSO	87.3-90.1%**	43.9-52.3%
Vitrificación	(Smorag <i>et al.</i> , 1989)	30% PROH+ 30%GLY	78%**	26%
	(Kasai <i>et al.</i> , 1992)	40%EG+18% Ficoll 70+0.3M sacarosa	17-87%**	60%
	(Kauffman <i>et al.</i> , 1998)	40%EG+18% Ficoll70+0.3M sacarosa	-	15-36%
	(Vicente and García-Ximénez, 1994)	20%EG-20%DMSO	64.6%	-
	(Vicente and García-Ximénez, 1994)	40%EG	23.8%	-
	(López-Béjar and López-Gatius, 2002)	25% EG + 0.25 M sacarosa	66.4%**	42%
	(López-Béjar and López-Gatius, 2002)	25%EG+25%GLY+0.25 sacarosa	70.5%**	51.7%
	(Papis <i>et al.</i> , 2005)	40%EG+18% Ficoll70+0.3M sacarosa	71%**	23.5%
	(Mehaisen <i>et al.</i> , 2005)	20%DMSO + 20% EG + 0.2% BSA	47.6-66.1%**	-
(Mehaisen <i>et al.</i> , 2006)	20%DMSO + 20% EG + 0.2% BSA	34.3-67.9%**	5.6-33%	

DMSO: Dimetilsulfóxido; PROH: Propilenglicol; GLY: Glicerol; EG: Etilenglicol. * Tasa de embriones que alcanzan el estadio de mórula **Tasa de embriones que alcanzan el estadio de blastocito; ***Tasa de nacidos vivos

1.5. Valoración de la calidad de embriones y ovocitos

El objetivo último de la producción y crioconservación de gametos es el nacimiento de descendencia viva y, por tanto, este dato siempre será la mejor valoración de las técnicas utilizadas con este objetivo. Sin embargo, en muchas ocasiones no es fácil de llevar a cabo debido, fundamentalmente al coste económico y de tiempo que supondría, así como al número de hembras de las que se debería disponer. Por otra parte, cuando se pretenden desarrollar procedimientos que nos permitan aumentar el número de ovocitos o embriones disponibles o su conservación, es importante conocer en qué medida y de qué forma afectan a las células y por lo que se requiere el uso de diferentes técnicas que nos permitan valorar la capacidad de desarrollo de los gametos utilizados.

En este contexto y teniendo en cuenta todas las variables, el método ideal para valorar los ovocitos y embriones debería ser rápido de realizar, económico, con alta fiabilidad y, preferiblemente, no invasivo (Goovaerts *et al.*, 2010). Sin embargo, a día de hoy, ningún método cumpliría todas estas características, por lo que la rutina habitual es la combinación de varios de ellos.

1.5.1. Apariencia morfológica

Uno de los primeros parámetros que puede valorarse de forma rápida y que ofrece bastante información es la apariencia morfológica de los ovocitos y embriones. Sin embargo, si bien esta valoración tiene las ventajas de ser rápida y barata, tiene un valor predictivo limitado y es un sistema sujeto a la variabilidad inter e intra-observador (Singh and Sinclair, 2007).

En el caso de los embriones que se encuentran en estadios tempranos, incluyendo el de mórula, se supone signo de calidad la homogeneidad de las células y la simetría (Donoghue *et al.*, 1992), así como otros parámetros como: el tiempo en que se dividen las células, la presencia de cuerpos de inclusión o el número de células (Singh and Sinclair, 2007). En el momento en que el

embrión alcanza el estadio de blastocisto cobra importancia como indicador de calidad, la valoración del número total de células, de aquéllas que forman la masa celular interna (MCI), así como la relación del número de éstas con las del trofoectodermo (Sirard *et al.*, 2006). Con el objetivo de valorar dichos parámetros, son especialmente útiles las tinciones que permiten observar todas las células (Sohn *et al.*, 2002; Makarevich *et al.*, 2007), o bien aquéllas que permiten realizar una tinción diferencial para las células de la MCI y las del trofoectodermo (Lechniak, 2002; Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006a).

Por otra parte, la observación morfológica de los ovocitos es el primer paso para determinar su calidad y se basa tanto en la morfología del *cumulus* como en la del citoplasma. La importancia de un *cumulus* en correcto estado, atendiendo tanto a su integridad como a su grado de compactación y al número de capas, ha sido señalada en numerosas ocasiones como indicador de calidad, ya que todas ellas son características necesarias para que el ovocito pueda adquirir la competencia que le permite ser fecundado de forma normal (Gilchrist and Thompson, 2007); de hecho, aunque son necesarias otras valoraciones complementarias, la del conjunto de *cumulus* y ovocito es una herramienta crucial para la selección de éstos últimos (Goovaerts *et al.*, 2010). Por otra parte, para considerarlos normales, se atiende (en función de su estadio) a la homogeneidad del citoplasma, a la presencia o ausencia de degeneración o fragmentación citoplasmática, a la presencia de picnosis en el núcleo, así como a las posibles fracturas de la zona pelúcida o la pérdida de forma esférica (Zanagnolo *et al.*, 1996; Tain *et al.*, 2000; Prentice and Anzar, 2011), resultando también interesante la valoración del diámetro del ovocito (Otoi *et al.*, 1997).

Sin embargo, la observación de las estructuras ovocitarias puede llevarse a cabo de una forma más exhaustiva. En la tabla 1.6, se presenta un resumen de algunas de las estructuras más frecuentemente evaluadas.

Tabla 0.6. Principales estructuras morfológicas observables en los ovocitos

ESTRUCTURAS MORFOLÓGICAS OBSERVABLES EN LOS OVOCITOS			
Estructura	Medio	Importancia	Autores
Gránulos corticales	Microscopía confocal, tinción con FITC-PNA	Indica correcta maduración	(Arias-Álvarez <i>et al.</i> , 2010; Lee <i>et al.</i> , 2006a)
Filamentos de actina en ovocitos	Microscopía confocal, tinción con FITC-faloidina	Se ven alterados por la criopreservación y superovulación	(Lee <i>et al.</i> , 2005; Lee <i>et al.</i> , 2006a; Salvetti <i>et al.</i> , 2010; Sohn <i>et al.</i> , 2002; Makarevich <i>et al.</i> , 2007)
Placa metafásica	Microscopía confocal, tinción con anticuerpos anti-tubulina conjugados con fluorescencia (habitualmente FITC)	Indica una correcta disyunción de los cromosomas	(Mandelbaum <i>et al.</i> , 2004)
	Polscope, microscopio de luz polarizada. Permite observar la cinética de la placa		(Cooke <i>et al.</i> , 2003; Mandelbaum <i>et al.</i> , 2004)
Cromosomas	Microscopía confocal o de fluorescencia. Con diferentes tinciones PI, DAPI, Hoechst 33342 o Sytox® Orange	Correcta alineación de los mismos	(Cai <i>et al.</i> , 2005; Lee <i>et al.</i> , 2005; Van Blerkom and Davis, 2001; Hodges <i>et al.</i> , 2002);(Vincent <i>et al.</i> , 1989; Tain <i>et al.</i> , 2000); (Salvetti <i>et al.</i> , 2010)
	Técnica TUNEL	Permite la observación de la fragmentación de ADN	(Van Blerkom and Davis, 2001; Contreras <i>et al.</i> , 2008)

*Estos autores realizaron esta valoración en embriones

1.5.2. Actividad metabólica

No obstante, como ya se ha comentado, la valoración morfológica por sí sola es insuficiente para predecir si un ovocito o embrión tendrá la capacidad de llegar a término (Krisher, 2004). Una de las alternativas que contribuye a predecir esta capacidad es la valoración de la actividad metabólica, ya que determinados defectos metabólicos de los ovocitos están asociados con fallos preimplantatorios (Van Blerkom *et al.*, 1995; Goovaerts *et al.*, 2010).

El desarrollo embrionario implica la consecución de unos pasos que requieren energía, cuya fuente principal, en el caso de los ovocitos y de los embriones en estadios preimplantatorios, es la producción de ATP mediante el metabolismo oxidativo por parte de las mitocondrias (Krisner, 2004), que, además, intervienen también en la homeostasis del calcio la apoptosis (Wang *et al.*, 2009).

En este contexto, dado que la ubicación de las mitocondrias varía a lo largo de la maduración ovocitaria, acumulándose en aquellas zonas en las que la demanda de energía se incrementa (Wang *et al.*, 2009; Van Blerkom, 2010) y se ha relacionado con la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Nagai *et al.*, 2006), su evidenciación a través de la tinción con rodamina 123 (Van Blerkom, 1991; Sohn *et al.*, 2002; Van Blerkom *et al.*, 2006) o de otras tinciones fluorescentes (Nagai *et al.*, 2006), sería una herramienta útil para su valoración.

No obstante, más allá de la identificación de las mitocondrias, la determinación del potencial de su membrana interna ($\Delta\Psi_m$) aporta gran información sobre su estado ya que parece estar relacionado con la capacidad de desarrollo del ovocito y con la correcta penetración del espermatozoide (Van Blerkom *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004; Van Blerkom and Davis, 2007); para ello, la tinción con JC-1, que se presenta en forma monomérica emitiendo verde fluorescente cuando el $\Delta\Psi_m$ es bajo y forma agregados cuya emisión es naranja fluorescente cuando éste es alto, es de gran utilidad (Sohn *et al.*, 2002; Van Blerkom *et al.*, 2006; Velez-Pardo *et al.*, 2007).

Sin embargo, no siempre un alto $\Delta\Psi_m$ se corresponde con un aumento en la producción de ATP (Van Blerkom *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004); de hecho, ésta es una útil determinación que aporta información adicional sobre el estado metabólico de los ovocitos y que se ha llevado a cabo en numerosas ocasiones y especies (Van Blerkom *et al.*, 1995; Van Blerkom *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006b), incluyendo el conejo (Salveti *et al.*, 2010), ya que existe una gran correlación entre la concentración del ATP en el ovocito y la capacidad de desarrollo del embrión resultante (Van Blerkom *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001; Cummins, 2002; Tamassia *et al.*, 2004;

Van Blerkom, 2004). Esta determinación puede llevarse a cabo también en el caso de los embriones (Rieger, 1997).

Dado que el ADN mitocondrial (ADNmt) no se replica hasta los estadios postimplantacionales (Spikings *et al.*, 2007), la valoración de la actividad mitocondrial puede completarse con la evaluación del daño sufrido por el mismo (Wang *et al.*, 2009), así como con el número de copias presente (Spikings *et al.*, 2007), ya que ambos parámetros parecen estar relacionados con la normalidad y la viabilidad de ovocitos y embriones (Van Blerkom, 2004).

Más allá de la valoración del estatus energético del ovocito, existe la posibilidad de valorar su metabolismo a través de diferentes determinaciones, algunas de ellas se citan en la tabla 1.7.

Por último, la realización de un análisis metabolómico puede ser muy útil para predecir de una forma no invasiva la viabilidad embrionaria y ovocitaria. Así, se llevaría a cabo el perfil metabólico del fluido folicular o del medio de cultivo basándose en la aparición o depleción de metabolitos, metabolitos de bajo peso molecular que representan los productos finales de los procesos celulares regulatorios (Houghton *et al.*, 2002; Singh and Sinclair, 2007). Para ello, se pueden utilizar técnicas como la espectrometría de masas con cromatografía de gases, de líquidos o con electroforesis capilar y con resonancia magnética nuclear (Singh and Sinclair, 2007).

Tabla 1.7. Principales valoraciones metabólicas en los ovocitos

VALORACIONES METABÓLICAS EN LOS OVOCITOS			
Valoración	Técnica	Importancia	Autores
Estrés oxidativo	Valoración de la producción de H ₂ O ₂ , mediante la incubación con DCHFDA	Relacionado con el correcto estado de las células	(Nasr-Esfahani and Johnson, 1991; Sohn <i>et al.</i> , 2002); (Velez-Pardo <i>et al.</i> , 2007).
Glutación	Valoración de la concentración de glutación a través de la reacción enzimática de la reductasa 5,5-dtio-bis(2-ácido nitrobenzoico)-glutathion disulfido	Representa el poder reductor frente a los ROS (radicales libres de oxígeno)	(de Matos <i>et al.</i> , 1997; Abeydeera <i>et al.</i> , 1998; Lubberda, 2005; Kim <i>et al.</i> , 2007)
Enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenada	Tinción mediante el azul cresil brillante (BCB)	Indica el estado de maduración del ovocito de forma no invasiva	(Torner <i>et al.</i> , 2008; Cai <i>et al.</i> , 2005; Goovaerts <i>et al.</i> , 2010)
Análisis metabolómico (metabolitos de bajo peso molecular resultado de los procesos celulares regulatorios)	Espectrometría de masas con cromatografía de gases, de líquidos o con electroforesis capilar y resonancia magnética nuclear	Perfil metabólico a través de la determinación de los metabolitos de bajo peso molecular resultado de los procesos celulares regulatorios	Houghton <i>et al.</i> , 2002; Singh and Sinclair, 2007

Por último, la realización de un análisis metabolómico puede ser muy útil para predecir de una forma no invasiva la viabilidad embrionaria y ovocitaria. Así, se llevaría a cabo el perfil metabólico del fluido folicular o del medio de cultivo basándose en la aparición o depleción de metabolitos, metabolitos de bajo peso molecular que representan los productos finales de los procesos celulares regulatorios (Houghton *et al.*, 2002; Singh and Sinclair, 2007). Para ello, se pueden utilizar técnicas como la espectrometría de masas con cromatografía de gases, de líquidos o con electroforesis capilar y con resonancia magnética nuclear (Singh and Sinclair, 2007).

1.5.3. Expresión génica

Durante la fase de crecimiento folicular, el ovocito transcribe y almacena una elevada cantidad de ARNm y de proteínas, cuya función está relacionada con el mantenimiento y regulación del desarrollo embrionario previo a la implantación y a su activación genómica (Krisner, 2004; Watson, 2007).

La técnica habitual para la cuantificación del ARNm es la qPCR a tiempo real, cuyo funcionamiento está plasmado en la figura 5 de modo esquemático, tras la realización de una transcripción inversa de ARNm a cADN.

El número de genes que aportan información sobre el grado de desarrollo o viabilidad es extensísimo y se ha estudiado en numerosas especies, como bovino (Rizos *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2002; Fair *et al.*, 2007; Torner *et al.*, 2008), ovino (Leoni *et al.*, 2008), porcino (Spikings *et al.*, 2007) o hamsters (Lee *et al.*, 2006a). En la tabla 1.8 (Wrenzycki *et al.*, 2007) se indican algunos de los genes relacionados con el desarrollo o viabilidad de los ovocitos y embriones.

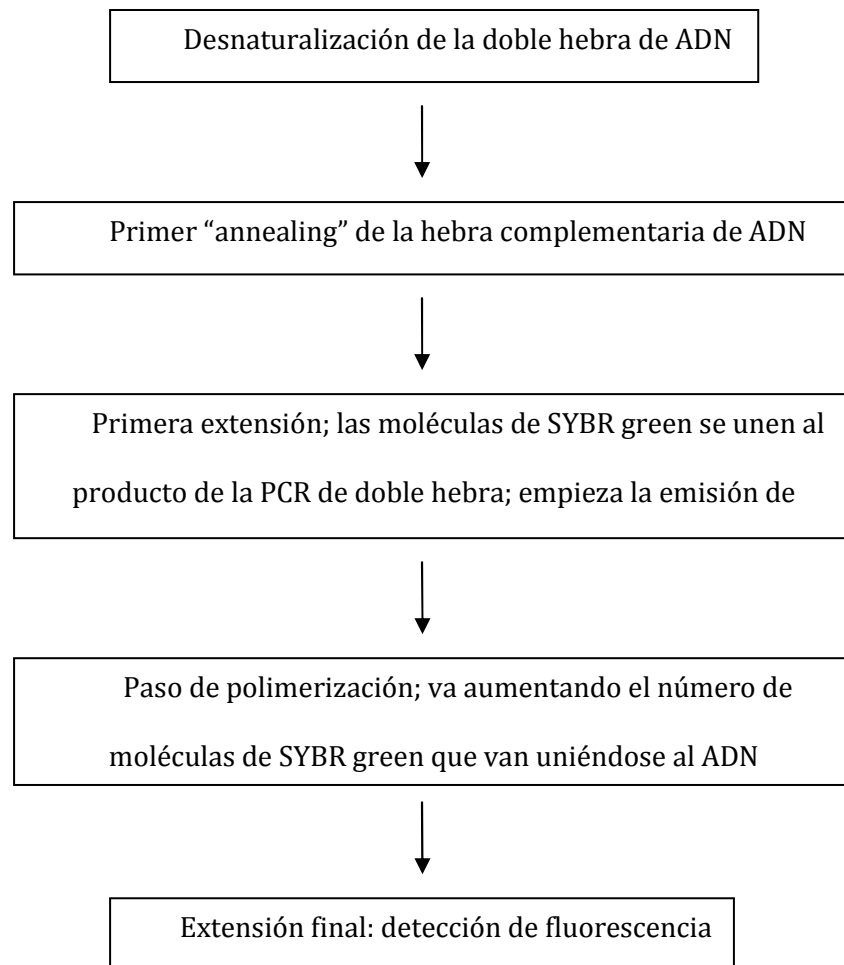


Figura 5. Figura esquemática de la técnica de PCR a tiempo real. Adaptado de Lechniak (2002).

Tabla 1.8. Impacto de los diferentes parámetros en la abundancia de ARN mensajero en embriones y ovocitos.

Parámetro	Abundancia de transcritos (Incremento o disminución)
Tamaño folicular	ARNpol1, PAP, CycA, Dja4, Msx1, NFDIP, Oct4, SLBP, Trappc, Znf198, GDF9, DYNLL1, DYNC111, PSNB2, SKIIP, CDC5L, RGS16, PROX 1, H2A, CKS1, PTTG1, CCNB2
Estadio de crecimiento folicular	HSP (durante maduración <i>in vivo</i>) PARN, MSY2, PAP, eIF-4E, IP3R, YY1 (en ovocitos de folículos persistentes)
Estadio de maduración meiótica <i>in vitro</i> (GVBD-MII)	VEGF, TIMP1, TGFβ1, DYNLL1, DYNC111, PMSB1, GPX, PGK, YY1, HMGA1, RY-1, ZAR, SUV39H1, G9A
Ambiente de maduración (<i>in vitro</i> vs. <i>in vivo</i>)	GDF9, cyclin B, FSHR, G6PDH, SOX, MnSOD, CuSOD
Suplementación del medio de maduración	HSP, PolyA, FSHR, Cx43, COX2, EP2, EP3 (en medio enriquecido con suero); Na/K a 1, cyclin A (en SOF sin aminoácidos); FAS, FASGL, STAT3 (en medio suplementado con leptina)
Calidad de los COC	EP3
Tiempo hasta la primera división	YEA, IDF, H2A, H3A, CCNB2, PTTG1, FS
Edad de los animales	ut, eIF1A, Subunidades de inhibina (βA, βB), FS

Adaptado de Wrenzycki *et al.* (2007).

Concretamente en conejo, si bien parece que hay controversia sobre en qué momento el cigoto comienza la transcripción de ARN, parece claro que de forma abundante, ésta empieza a producirse tras el estadio de 8 células (Kanka, 2003). Entre otros, se han estudiado; el factor de transcripción OCT-4, esencial en el desarrollo preimplantatorio; el receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico (erbB3), relacionado con la relación materno-embriónica, la formación de la placenta y el control del crecimiento, diferenciación y apoptosis celular; el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), relacionado con la neovascularización y el factor de crecimiento de

transformación (TGFB), relacionado con la proliferación, diferenciación, adhesión, migración y muerte celular (Saenz-de-Juano *et al.*, 2011).

1.5.4. Viabilidad

Por último, los métodos para evaluar la calidad de los ovocitos y embriones pueden completarse valorando la viabilidad de los mismos.

Para ello, de entre las diferentes opciones que pueden llevarse a cabo en la valoración de los embriones de conejo (Kasai *et al.*, 1992; Chrenek *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1999; López-Béjar and López-Gatius, 2002; Silvestre *et al.*, 2003; Vicente *et al.*, 2003; Hochi *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2004; Naik *et al.*, 2005; Makarevich *et al.*, 2007) probablemente la más frecuente por su simplicidad y por la información que aporta es el cultivo *in vitro* de los mismos, considerando viables aquéllos que alcanzan el estadio de blastocisto expandido o escapado en el tiempo adecuado, dada la relación que existe entre el tiempo de la primera división post-inseminación y la competencia de desarrollo (Lonergan *et al.*, 2003).

Sin embargo, en esta especie, dada la relativa facilidad que presenta, la transferencia de los embriones a una hembra receptora para la valoración de los embriones llegados a termino, la transferencia de los mismos es también muy frecuente (Maurer *et al.*, 1968; Kasai *et al.*, 1992; Kauffman *et al.*, 1998; López-Béjar and López-Gatius, 2002; Vicente *et al.*, 2003; Hochi *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2004; Naik *et al.*, 2005).

Por otra parte, la viabilidad de los ovocitos de conejo puede valorarse de distintos modos, ya sea mediante partenogénesis (Ozil and Huneau, 2001; Liu *et al.*, 2002; Salvetti *et al.*, 2010; Naturil-Alfonso *et al.*, 2011), ICSI (inyección intracitoplasmática) (Cai *et al.*, 2005) o fecundación *in vitro* (Brackett *et al.*, 1972; al-Hasani *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es incrementar el número de ovocitos y embriones de calidad obtenidos por coneja. Para ello, se establecen los siguientes objetivos:

- ✓ Evaluar el efecto de las gonadotropinas recombinantes humanas (rhFSH y rhLH) sobre la estimulación ovárica de la coneja, determinando el impacto de la LH sobre el desarrollo embrionario *in vitro* tanto en embriones frescos como en congelados.
- ✓ Estudiar el efecto tanto sobre la respuesta ovulatoria como sobre la respuesta inmune de las hembras, de la aplicación de hasta cuatro tratamientos de superovulación sucesivos.
- ✓ Valorar el impacto del origen de la FSH (porcina o recombinante humana), así como de los protocolos de superovulación sobre la calidad ovocitaria.
- ✓ Validar un método mínimamente invasivo de recuperación de ovocitos de coneja en metafase II y valorar su eficacia tras la administración de un tratamiento de superovulación.
- ✓ Desarrollar un medio de crioconservación por vitrificación que maximice el número de embriones de calidad tras la desvitrificación.

PARTE EXPERIMENTAL

Experimento 3.1

3.1. Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments

3.1.1 Abstract

This study aimed first to evaluate the effect of recombinant human FSH (rhFSH) with and without recombinant human LH (rhLH) on fresh and frozen-thawed embryo development and also to analyze the immune response of rabbit does (*Oryctolagus cuniculus*) subjected to repeated rhFSH treatments. Nulliparous New Zealand White does were used. In Experiment 1, 120 does were superovulated with 25 IU rhFSH alone or in combination with 5% or 10% rhLH (1.25 IU or 2.50 IU rhLH). A total of 1116 embryos at the compacted morula stage were cultured at 38.5 °C, 5% CO₂, and saturated humidity for 48 h. The embryo development to hatching blastocyst was significantly lower for the group with 10% rhLH versus that of the control group (65.6 vs. 79.5 for rhFSH + 10% rhLH vs. control, respectively). However, no significant difference was found in development to hatching blastocyst for the control, rhFSH alone, and rhFSH + 5% rhLH groups. The developmental potential of frozen-thawed embryos obtained from all groups was similar, with an 83.5% in vitro development rate until the expanded blastocyst stage. To detect antiFSH antibodies, in Experiment 2, does were subject to four superovulation treatments. The hormone administration had a significant effect on immune response in the superovulation group after two treatments (0.14 ± 0.074 and 0.15 ± 0.076 vs. 0.46 ± 0.078 and 0.50 ± 0.078 optical density for the first, second, third, and fourth cycles, respectively). Nevertheless, none of the treated does had an immune response in both the first and second treatments; on the contrary, a significant increase in the antibody levels was observed in these females at the moment of the third and fourth superovulation treatments. In conclusion, rhFSH superovulation treatments increase the reproductive potential of rabbit does.

*This study has been published in *Theriogenology* 2009; 72: 655-662.

3.1.2. Introduction

Major advances in research are often achieved thanks to animal experimental models. Rabbits are frequently used for studies in reproductive biotechnologies and genetic modeling, but embryo yield and quality after superovulation is highly variable, and so the routine application of these protocols is considerably limited. Superovulation is normally applied to produce the maximum number of transferable embryos per donor female, and it may significantly affect the efficiency of embryo recovery. Superovulation requires the administration of exogenous gonadotropin to produce *in vivo*-derived embryos. However, one major problem with this kind of application is the unpredictable nature of ovarian response, fertilization rate, and embryo development, which leads to considerable variation in the yield and quality of the embryos produced after treatment (Boland *et al.*, 1991). In addition to donor characteristics, such as breed, age, and reproductive status, many other factors are assumed to contribute to this unpredictability (Leiner *et al.*, 1986), including the variability in the follicle-stimulating hormone/luteinizing hormone (FSH/LH) ratio of gonadotropin preparations (Murphy *et al.*, 1984; Donaldson and Ward, 1986; Lindsell *et al.*, 1986; Kafi and MmcGowan, 1997). Although the role of LH in steroid synthesis and ovulation is well established, the influence and the amount of LH necessary for optimal follicular stimulation is still being investigated. An excessive level of LH in gonadotropin preparations has been found to adversely affect the success of superovulation in cattle, in terms of both the number of ovulations induced and that of transferable embryos recovered (Murphy *et al.*, 1984; Chupin *et al.*, 1984; Callesen *et al.*, 1986). In horses, an increase in FSH/LH ratio did not appear to significantly improve the superovulatory response (Hofferer *et al.*, 1993; Rosas *et al.*, 1998). This discrepancy in results might be due to the variations in the composition of each of the gonadotropin preparations used. More recently, this problem has been resolved through recombinant ADN technology, which allows for the production of FSH without contaminating LH. Recombinant bovine FSH has been reported to induce superovulation at a rate comparable with that of pituitary FSH products, possibly with improved average embryo quality, despite the absence of exogenous LH (Wilson *et al.*, 1993). By contrast, it was observed that with recombinant human FSH (rhFSH), when there were multiple ovulations, the

final follicular maturation was impaired compared with that of eCG equine Chorionic Gonadotropin treatment (Takagi *et al.*, 2001). Recombinant human FSH has also been shown to induce multiple ovulation in primates (Cseh *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007) and in rodents (Vaan Cappellen *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2005), and it is routinely used in human assisted-reproductive technologies (Levi-Setti *et al.*, 2006). The literature available on the effect of rhFSH is limited and deals mainly with the yield of embryos and oocytes. Studies into the effect of exogenous LH administration on embryo viability, developmental potential, and cryotolerance are, to own knowledge, scarce.

Superovulation treatments with eCG or FSH preparations isolated from the pituitary gland are commonly used in rabbit does (Besenfelder, 2002; Tsiligianni *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2006; Mehaisen *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2007b); however, at present, there are no data regarding the effect of rhFSH on the ovulatory response in rabbit does.

On the other hand, when embryos are recovered from animals with high genetic value, the chance of recovering more than once from the same female is essential to maximize the number of embryos or oocytes collected (Medjoub *et al.*, 2000; Forcada and López, 2000; Mehaisen *et al.*, 2004). Several studies have demonstrated the refractoriness to repeated gonadotropic treatment in different species (Mehaisen *et al.*, 2006; Swanson *et al.*, 1996; Van Blerkom and Davis, 2001; Combelles and Albertini, 2003). This reduced response may be related to an increase in anti-gonadotropin antibodies in animals repeatedly treated with gonadotropins (Swansson *et al.*, 1996; Roser *et al.*, 1979, Boiti *et al.*, 1995).

The current study aims first to identify the effects of recombinant human gonadotropins on ovarian stimulation in rabbit does (*Oryctolagus cuniculus*), then to determine the impact of this stimulation on in vitro development of fresh and cryopreserved embryos, and finally to evaluate the immune response of does subjected to repeated rhFSH treatments.

3.1.3. Materials and methods

The research was carried out at the experimental farm of the Animal Technology Centre (Segorbe, Castellón). The experiments were approved by the Ethics Committee of the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

3.1.3.1. Experiment 1

Animals

One hundred twenty nulliparous, sexually mature New Zealand White doe rabbits were used. Animals were housed in flat deck cages, fed a standard pellet diet ad libitum, and had free access to water. An alternating cycle of 16 h light and 8 h dark was used.

Hormonal treatment

Superovulation was induced using rhFSH (Gonal-F 75; Serono Europe Ltd., London, United Kingdom) alone or in combination with recombinant human LH (rhLH; Luveris 75; Serono Europe Ltd., London, United Kingdom). Does were treated intramuscularly with 25 IU rhFSH alone (1.8 µg) or in combination with either 1.25 IU or 2.50 IU rhLH (5% or 10%) dissolved in polyvinylpyrrolidone 30% (PVP; Sigma-Aldrich Quimica S.A., Madrid, Spain) distributed in three equal doses at 24-h intervals. Does were inseminated, and ovulation was induced with 2 µg buserelin acetate (Suprefact; Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, Spain) given intramuscularly 24h after the last gonadotropin injection. Females were assigned randomly to four treatment groups:

Group 1: Superovulation was induced using rhFSH alone.

Group 2: Superovulation was induced using rhFSH in combination with 5% rhLH.

Group 3: Superovulation was induced using rhFSH in combination with 10% rhLH. Group

4: Control group, females were not superovulated but were treated intramuscularly with the vehicle (PVP 30% solution) at the same time as the other three groups.

Embryo recovery

Embryos were collected 68 to 72 h after artificial insemination at compacted morula stage. Animals were anesthetized with an intramuscular injection of 0.4 mL xylazine 2% (Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Germany) and an intravenous injection of 1.2 mL/kg body weight ketamine (Imalgene; Merial S.A., Lyon, France). Then, the abdominal region was shaved and disinfected. Animals were placed on the operating table in dorsal recumbence and head down positioned at a 45-degree angle. Laparoscopy was performed to determine the ovulation rate and to clamp the uterine horns with nontraumatic forceps. Each uterine horn was flushed with 50 mL Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Sigma, St Louis, MO, USA) containing 0.2% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). The uterine content was collected from the vagina using a sterile flushing catheter with a Foley end connected to a vacuum pump. The collection tubes were sterile and placed at 38 °C in a thermoplate before collection with 5 mL of the flushing medium. The recovered fluid was then transferred into sterile Petri dishes for examination under a stereomicroscope. Embryos were scored by morphologic criteria according to International Embryo Transfer Society classification. Only embryos in morula stage with homogeneous blastomeres and both regular mucin coat and zona pellucida were considered to be normal embryos.

Records were taken for the ovulation rate, normal embryos, abnormal embryos, oocytes, normality rate (normal embryos/total embryos), abnormality rate (oocytes + abnormal embryos/total embryos + oocytes), total recovered (normal embryos + abnormal embryos + oocytes), and the recovery rate (oocytes + normal embryos + abnormal embryos/ovulation rate).

Embryo freezing-thawing procedure

A total of 514 embryos were frozen. Embryos were placed successively for 5min into three different solutions consisting, respectively, of 0.5 M dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain), 1 M DMSO, and 1.5 M DMSO in DPBS supplemented with 0.2% BSA. Then the embryos suspended in the cryopreservation medium were loaded into 0.25-mL sterile plastic straws (IMV, L'Aigle, France) between two drops of DPBS separated by air bubbles and sealed

with a sterile plug. The straws were then placed directly into a programmable freezer (Cryologic Pty Ltd, Mulgrave, Australia) and were frozen following Menezo's two-step slow-freezing protocol. In brief, embryos were equilibrated 10 min at -7°C ; after a 5-min equilibration period, manual seeding was performed. Then, embryos were cooled to -35°C at a freezing rate of $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ before plunging the straws directly into liquid nitrogen.

Thawing was performed by placing the straws at room temperature for 10 to 15 sec before plunging them into a water bath at 20°C for 1 min. After thawing, the cryopreservation medium was removed while loading the embryos successively for 5 min into two different solutions containing 1 M DMSO and 0.5 M DMSO in holding medium, respectively, and then into two baths of only holding medium.

In vitro culture

A total of 1116 embryos were cultured (602 fresh and 514 frozen-thawed embryos). Eight replicates for embryo viability evaluation were performed. Embryos were cultured for 48 h in medium TCM-199 + 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich Quimica S.A., Madrid, Spain) at 38.5°C , 5% CO_2 , and saturated humidity. Embryo viability and the developmental stages of fresh and thawed embryos were assessed and recorded for later subsequent analysis.

Statistical analysis

Data were statistically evaluated with several Statgraphics Plus library procedures (Statgraphics Plus 5.1; Addlink Software Científico, S.L., Barcelona, Spain). The differences in embryo production in response to the four treatments (rhFSH, rhFSH + 5% rhLH, rhFSH + 10% rhLH, and control) were analyzed by ANOVA in terms of the embryo donor rate, ovulation rate, total recovered (normal embryos + abnormal embryos + oocytes), normal embryos, abnormal embryos, oocytes, normality rate (normal embryos/ total embryos), and abnormality rate (oocytes + abnormal embryos/total embryos + oocytes) using the General Linear Models (GLM) procedure of Statgraphics Plus 5.1. A chi-squared test with Yate's correction was used to determine the effect of the treatment

(rhFSH, rhFSH + 5% rhLH, rhFSH + 10% rhLH, and control) on the percentage of damaged embryos and on the results of in vitro viability assays (blastocyst rate).

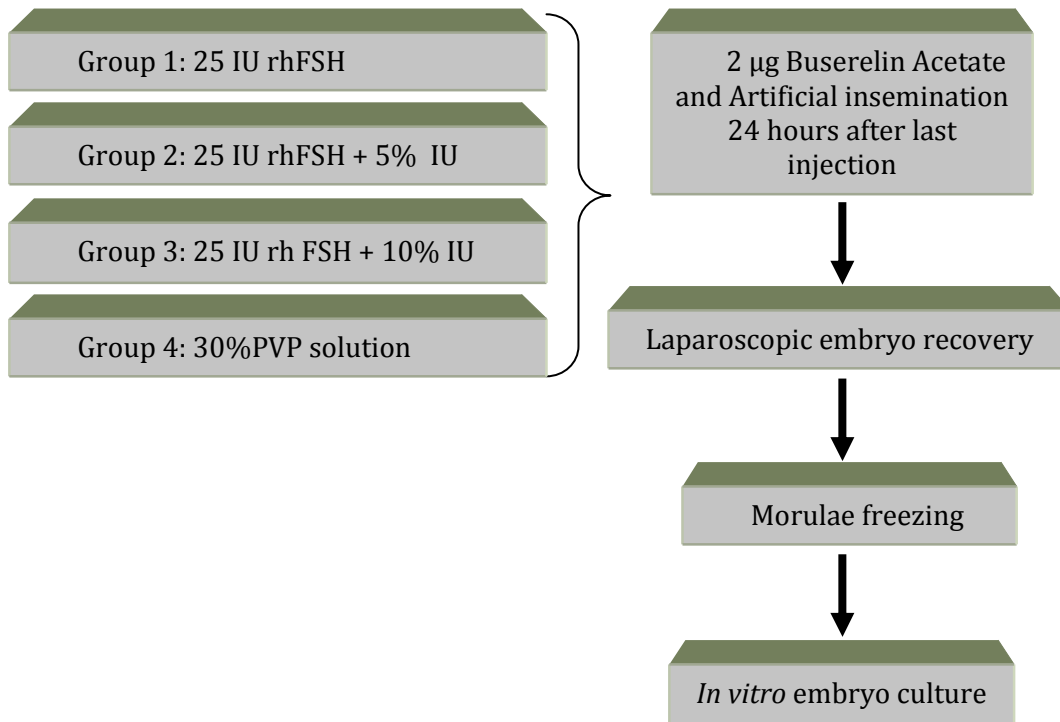


Figure 6. Experimental design resume

3.1.3.2. Experiment 2

To detect anti-FSH antibodies in rabbits, 40 nulliparous, sexually mature New Zealand White doe rabbits were used for this experiment (20 control and 20 rhFSH treatment). Two does died during the experiment, and six does failed to ovulate. These cases were not considered in the analysis of data.

Superovulation treatment

The superovulation group received rhFSH alone as described previously in Experiment 1, and the control group received the vehicle at the appropriate time as in Experiment 1.

Does were subjected to up to four superovulation treatments. Between each treatment (Cycles 1 to 3), females were allowed to recover for 1 month. In addition, between the third and the

fourth treatment, females were allowed to give birth and to recover for 3 months. In this case, females were first inseminated without superovulation treatment. Only receptive females (determined by red color of vulvar lips) were inseminated. All the females were treated intramuscularly at the moment of insemination with a synthetic analogue of GnRH (2 µg busserelin acetate; Suprefact; Hoechst Marion Roussel) to induce the ovulation. All the does were allowed to breed, and finally, after weaning, they were superovulated.

Blood sampling

Blood samples were taken from all does before receiving any rhFSH treatment. Blood samples were collected 6 d after beginning each superovulation treatment (6, 36, 69, and 159 d from the first rhFSH injection for the first, second, third, and fourth superovulation cycle, respectively). The ovulation rate was estimated by laparoscopy. Blood was collected and centrifuged (20 min at 1500 x g). Sera were frozen and stored at -80 °C until assaying.

Detection of anti-FSH antibodies

Indirect ELISA was used to detect anti-FSH antibodies with a protocol adapted from Haller et al. (2007). Briefly, polystyrene 96-well plates (Corning) were coated with 1.1 mg/mL FSH in a carbonate-bicarbonate buffer (40 mM Na₂CO₃, 60 mM NaHCO₃, pH 9.6) at 100 µL per well. Plates were incubated for 16 h at 4 °C and washed with PBS- T (PBS and 1% Tween 20). Serum samples diluted to 1:50 in a blocking buffer (PBS, 0.5% Tween, 5% BSA) were added and incubated for 1.15 h at 37 °C. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (Ig) was diluted 1:4000 in the blocking buffer and added to each well after plates were washed. Plates were incubated for 1.15 h at 37 °C in the dark. Orthophenylamine and H₂O₂ in the developing buffer (citric acid, Na₂HPO₄) were added after washing plates, and color development was blocked after 10 min. Then, the optical density was read using a multilabel counter for ELISA plates equipped with a 405-nm filter.

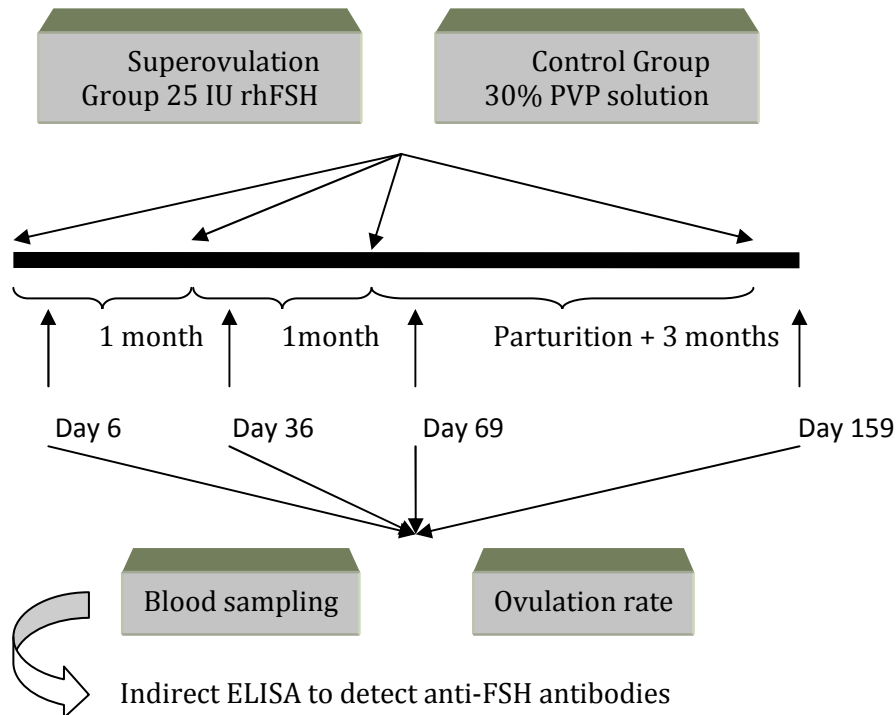


Figure 7. Experimental design resume

Statistical analysis

The effect of treatments (repeated rhFSH and control) on the ovulation rate and anti-FSH antibody formation was analyzed by ANOVA using the GLM procedure of Statgraphics Plus 5.1.

3.1.4. Results

3.1.4.1. Experiment 1

Embryo recovery

The embryo donor rate was 94.4%; only 8 females of the 120 did not ovulate. Results of the superovulation treatments on the recovery variables are shown in Table 3.1.1. The embryo production treatment did not significantly affect recovery rates. The number of oocytes was very low, and their value did not differ significantly among groups (0.85 ± 0.28). Additionally, the proportion of normal embryos suitable for cryopreservation based on morphologic criteria was very high (99%) and did not vary among treatment groups. There were not any statistical differences among the superovulation-treated experimental groups with respect to the ovulation rate and total recovered

embryos. The three groups subjected to superovulation treatments showed a significant increase in higher ovulation rates compared with that of the control group (20.24 ± 1.62 , 18.46 ± 1.78 , 18.41 ± 1.62 vs. 10.56 ± 1.68 , for rhFSH, rhFSH + 5% rhLH, rhFSH + 10% rhLH, and control group, respectively; Table 3.1.1). The total recovered per donor was significantly higher in superovulated does than in control does (17.21 ± 1.73 , 16.89 ± 1.90 , 14.31 ± 1.73 vs. 7.67 ± 1.69 of total recovered per donor for rhFSH, rhFSH + 5% rhLH, rhFSH + 10% rhLH, and control group, respectively; Table 3.1.1). Similarly, the number of normal embryos per donor was also higher as a result of superovulation treatments (15.38 ± 1.77 , 15.89 ± 1.95 , 13.66 ± 1.77 vs. 7.33 ± 1.82 , normal embryos per donor for rhFSH, rhFSH + 5% rhLH, rhFSH + 10% rhLH, and control group, respectively, $P < 0.05$; Table 3.1.1).

Table 3.1.1. Effect of embryo production treatment on recovery variables (least square means \pm standard error)

Group	N	RR	OR	TR	NE	AE	OO	NR	AR
rhFSH alone	29	84.94 \pm 5.0	20.24 \pm 1.6 2 ^a	17.21 \pm 1.73 ^a	15.38 \pm 1.77 ^a	0.21 \pm 0.06	1.62 \pm 0.5	98.96 \pm 0.6	11.7 \pm 4.1
rhFSH+5%rhLH	24	88.42 \pm 5.5	18.46 \pm 1.78 ^a	16.89 \pm 1.90 ^a	15.89 \pm 1.95 ^a	0.04 \pm 0.07	0.96 \pm 0.6	99.87 \pm 0.7	11.0 \pm 4.6
rhFSH+10%rhLH	29	77.17 \pm 5.0	18.41 \pm 1.62 ^a	14.31 \pm 1.73 ^a	13.66 \pm 1.77 ^a	0.07 \pm 0.06	0.59 \pm 0.5	99.63 \pm 0.6	4.6 \pm 4.1
Control	28	74.20 \pm 5.2	10.56 \pm 1.68 ^b	7.67 \pm 1.79 ^b	7.33 \pm 1.82 ^b	0.11 \pm 0.06	0.22 \pm 0.6	97.55 \pm 0.6	6.1 \pm 4.2

N, number of does; RR, recovery rate; OR, ovulation rate; TR, normal embryos + abnormal embryos + oocytes; NE, normal embryos; AE, abnormal embryos; OO, oocytes; NR, normality rate (normal embryos/total embryos); AR, abnormality rate (oocytes + abnormal embryos/total embryos + oocytes). ^{ab} Values in the same column with different superscripts are statistically different ($P < 0.05$).

Developmental potential

There was no significant difference among the four experimental groups for fresh embryo development until the expanded blastocyst stage (96.8%, 93.9%, 92.8%, and 98.9% for rhFSH, rhFSH + 5% rhLH, rhFSH + 10% rhLH, and the control group, respectively). The embryo development until

hatching blastocyst was significantly lower for the group rhFSH + 10% rhLH versus that of the control group (65.6 vs. 79.5 for rhFSH + 10% rhLH vs. control, respectively; Table 3.1.2). However, no significant difference was found in development to hatching blastocyst for the control, rhFSH alone, and rhFSH + 5% rhLH groups.

The developmental potential of frozen-thawed embryos obtained from all groups was similar, with an average 83.5% in vitro development rate until the expanded blastocyst stage. There were no significant differences in the proportion of undamaged embryos after thawing or in the overall efficiency of the process among groups (Table 3.1.2).

Table 3.1.2. *In vitro* viability of embryos.

	rhFSH alone	rhFSH+5%rhLH	rhFSH+10%rhLH	Control
	Fresh embryos			
Number of embryos	187	131	195	89
Development to blastocyst, %	96.8	93.9	92.8	98.9
Hatching rate %	73.3 ^{ab}	69.7 ^{ab}	65.6 ^b	79.5 ^a
	Frozen-thawed embryo			
Number of embryos	147	110	137	120
Undamaged embryos, % *	73.5	85.5	80.3	81.6
Cultured embryos	108	94	105	98
Development to blastocyst, %	94.4	89.4	92.4	90.8
Hatching rate, %	89.8	79.8	88.6	81.6
Overall efficiency	66.0	68.2	71.5	71.4

* Undamaged embryos: number of intact embryos/total frozen embryos. ^{ab}Values in the same row with different superscripts are statistically different ($P < 0.05$).

3.1.4.2. Experiment 2

The ovulation rate in the superovulation group was significantly higher in does treated for the first time with rhFSH than in those treated two, three, or four times (Table 3.1.2). The ovulation rate was significantly higher in the superovulation group than that in the control group. A significant effect of the hormone administration on immune response was observed in superovulation group after two treatments (0.14 ± 0.074 and 0.15 ± 0.076 vs. 0.46 ± 0.078 and 0.50 ± 0.078 optical density for the first, second, third, and fourth cycles, respectively; Table 3.1.2). Nevertheless, none of the treated females had an immune response in both the first and second treatments; on the contrary, these females had significantly higher antibody level at the time of the third and fourth superovulation treatments (Table 3.1.2).

Table 3.1.3. Effect of repeated rhFSH treatment (S1 to S4) on ovulation rate and anti-FSH antibody production (least square means \pm standard error)

	Control	S1	S2	S3	S4
Ovulation rate (N)	9.1 \pm 1.47 ^c (18)	18.5 \pm 1.43 ^a (19)	13.8 \pm 1.47 ^b (18)	12.1 \pm 1.51 ^{bc} (17)	13.6 \pm 1.51 ^b (17)
Anti-FSH response* (N)	0.16 \pm 0.076 ^b (18)	0.14 \pm 0.074 ^t (19)	0.15 \pm 0.076 ^t (18)	0.46 \pm 0.078 ^a (17)	0.50 \pm 0.078 ^a (17)

N, number of rabbit does; S1, does rhFSH-treated once; S2, does rhFSH-treated twice; S3, does rhFSH-treated three times; S4, does rhFSH-treated four times. * Anti-FSH response is measured in optical density

^{a-a-c}Values within the same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

3.1.5. Discussion

The results of Experiment 1 indicate that superovulation treatment with rhFSH alone or in combination with rhLH induces a superovulatory response in doe rabbits. The rhFSH dose used in this experiment resulted in an ovarian response comparable with results previously reported using other FSH preparations (Mehaisen *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007b). The capacity of the embryo to develop in vitro until the blastocyst stage seems to be a reliable marker of quality (Meldrum, 1999). In this study, the absence of LH in the ovarian stimulation resulted in an

embryo development similar to that of the control group for both fresh embryos and frozen-thawed embryos. Additionally, our findings revealed that ovarian stimulation induced with 10% rhLH in combination with rhFSH seems to adversely affect fresh embryo in vitro development. This may be due to the total concentration of LH in this group of females. In fact, the exogenous application of ovine FSH in rabbits suppresses the endogenous FSH secretion of does within 5 min after the injection, but even high doses of exogenous LH failed to suppress endogenous rabbit LH (Laborde *et al.*, 1981). On the other hand, when rhLH is administered in combination with rhFSH in primates (Zelinski Wooten *et al.*, 1995), there is a rhLH threshold concentration for optimal oocyte fertilization and subsequent embryo development. Moreover, an excessive LH concentration may disrupt granulosa cell communication in the cumulus oophorus, which is critical to maintain the oocyte in the late diplotene stage of meiosis until ovulation (Filicori, 1999). Therefore, it is possible that the optimal LH dose might have been exceeded in our study, and this could explain the lower proportion of development to hatching blastocyst in the 10% rhLH group for fresh embryos.

The results of embryo viability after cryopreservation obtained in the current study are similar or superior to those reported by other authors who used different cryopreservation procedures (Mehaisen *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007; López-Béjar and López-Gatius, 2002; Naik *et al.*, 2005). Our results suggest that the superovulation treatments used did not affect the capacity of superovulated embryos to recover their structural and functional integrity after thawing.

Repeated rhFSH treatment in doe rabbits leads to a decrease in both the ovulation rate and the superovulation response. Nonetheless, the ovulation rate of females superovulated two, three, and four times was significantly higher than that of the control females. Although there was a decline in ovulation rate after the first cycle, a detectable concentration of antibodies was produced against the rhFSH after two superovulation cycles. These results are in agreement with Mehaisen *et al.* (2006), who used oFSH (ovine FSH) or eCG and observed a drop in the ovulation rate after the second treatment with eCG or FSH; however, when the hormones were interchanged, a superovulatory response was noted again. These findings also agree with those reported by Renard

et al. (1982), who observed a reduction in the number of recovered embryos after repeating eCG and FSH treatments. This effect could be related to an immune response. We noted that, while the ovulation rate and superovulation response diminished with the second treatment, the immune response was detected in the third one. Swanson *et al.* (1996) found an increase in anti-eCG titer in cats immediately after the superovulation treatment. By contrast, in sheep and wallaby studies, the highest immune response appeared several days after the injection (Rot *et al.*, 1999; Magarey *et al.*, 2003). Nevertheless, Roy *et al.* (1999) reported that the response appeared earlier with the second treatment than it did with the first. In our study, blood was collected immediately before and after the rhFSH injections; more antibodies were detected mainly in those samples collected after the treatment. It is possible that with the second treatment there were anti-FSH antibodies, but their production began after a few days. On the other hand, we observed a notable individual variability in the immune response to rhFSH. This variability in the development of antibodies in response to different gonadotropin hormones after repeated injections has also been described in rabbits and other species (Bourdillon *et al.*, 1992; Lebas *et al.*, 1996; Remy *et al.*, 1991; Baril *et al.*, 1992; Baril *et al.*, 1996; Drion *et al.*, 2001; Roser *et al.*, 1979). In rabbits, an increase in serum anti-eCG antibodies has been noted after repeated treatments with low doses of eCG (25 to 40 IU) (Bourdillon *et al.*, 1992; Boiti *et al.*, 1995; Lebas *et al.*, 1996). After seven treatments with eCG, 30% of the treated females developed an immune response that increased in proportion to the number of injections received (Lebas *et al.*, 1996). These results confirm our own as females that developed an immune response after the third treatment responded as well after the fourth one. Effects of repeated FSH or eCG treatments on fertility or prolificacy response are varied. In some studies, no differences in the number of recovered oocytes, prolificacy, or fertility after repeated treatments were reported (Roy *et al.*, 1999; Magarey *et al.*, 2003; Lubbadah *et al.*, 1980; Caligara *et al.*, 2001). However, a decrease in ovarian response or ovulation rate was detected in other cases (Swanson *et al.*, 1996; Löseke *et al.*, 1996). A decrease in reproductive response and in embryo quality has been related to the interval among treatments in different species (Swanson *et al.*, 1996; Van Blerkom and Davis, 2001; Lubbadah *et al.*, 1980; Kanayama *et al.*, 2000), yet in other studies, the reproductive response was

not affected (Caligara *et al.*, 2001). Our findings indicate that after extending the time between treatments to more than 1 month, even if does were allowed to breed and were superovulated after weaning, neither the ovulation rate nor superovulation response were enhanced. Moreover, the number of females that presented sera anti-FSH antibodies increased.

In conclusion, findings from the current study suggest that the concentration of endogenous LH is sufficient to achieve adequate follicular maturation during ovarian stimulation with rhFSH alone. Additionally, the quality of embryos from rhFSH-treated does, in terms of cryotolerance, is similar to that of untreated does. Thus, rhFSH can be used for superovulation treatment in rabbits without affecting the quality of frozen-thawed embryos. By contrast and although anti-FSH antibodies result in a decrease in superovulation response, the ovulation rate of females superovulated two, three, and four times was significantly higher than that of the control females. These results clearly demonstrate that repeated rhFSH superovulation treatments are an efficient way to obtain a large number of quality embryos and to increase the reproductive potential of doe rabbits.

3.1.6. References

- Baril G, Remy B, Leboeuf B, Beckers JF, Saumande J. Synchronization of oestrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time occurrence of oestrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 1996;45: 1553–9.
- Baril G, Remy B, Vallet J, Beckers JF. Effect of repeated use of progestagen-PMSG treatment for estrus control in dairy goats out of breeding season. *Reprod Dom Anim* 1992;27:161–8.
- Besenfelder U, Raska R, Egerbacher M, Mosslacher G, Brem G. Influence of progesterone synchronization on ovarian histology, ovulation capacity and embryo production in FSH or PMSG superovulated rabbits. *Theriogenology* 2002;57. 533 [abstract].
- Boiti C, Castellini C, Canali C, Zampini D, Monaci M. Long term effect of PMSG on rabbit does reproductive performance. *World Rabbit Sci* 1995;3:51–6.
- Boland MP, Goulding D, Roche JF. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 1991;35:5–17.
- Bourdillon A, Chmitelin F, Jarrin D, Perez V, Rouillere H. Effects of a PMSG treatment on breeding results of artificially inseminated rabbits. *J Appl Rabbit Res* 1992;15:530–7.
- Caligara C, Navarro J, Vargas G, Simón C, Pellicer A, Remohí J. The effect of repeated controlled ovarian stimulation in donors. *Hum Reprod* 2001;16(11):2320–3.
- Callesen H, Greve T, Hyttel P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 1986;25:71–86.
- Chupin D, Combarous Y, Procureur R. Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. *Theriogenology* 1984;21. 229 [abstract].
- Combelles CMH, Albertini DF. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. *Biol Reprod* 2003;68:812–21.
- Cseh S, Corselli J, Chan P, Bailey L. Superovulation using recombinant human FSH and ultrasound-guided transabdominal follicular aspiration in baboon (*Papio anubis*). *Anim Reprod Sci* 2002;70:287–93.
- Donaldson LE, Ward DN. Effects of luteinising hormone on embryo production in superovulated

- cows. *Vet Rec* 1986;119:625–6.
- Drion PV, De Roover R, Houtain JY, Mcnamara EM, REMY B, Sulon J, Beckers JF. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. *Reprod Nutr Dev* 2001;41:207–15.
- Edwards LJ, Kind KL, Armstrong DT, Thompson JG. Effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288(5):E845–51.
- Filicori M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril* 1999;71(3):405–14.
- Forcada F, López M. Repeated surgical embryo recovery and embryo production in rabbits. *Anim Reprod Sci* 2000;64:121–6.
- Haller K, Salumets A, Grigorova M, Talja I, Salur L, Béne MC. Putative predictors of antibodies against follicle-stimulating hormone in female fertility: a study based on in vitro fertilization patients. *Am J Reprod Immunol* 2007;57:193–200.
- Hashimoto S, Kuramochi T, Aoyagi K, Takahashi R, Ueda M, Hirao M. Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation treatment. *Exp Anim* 2004;53(4):395–7.
- Hofferer S, Lecompte F, Magallom T, Palmer E, Combarous Y. Induction of ovulation and superovulation in mares using equine LH and FSH separated by hydrophobic interaction chromatography. *J Reprod Fertil* 1993;98:597–602.
- Kafi M, McGowan MR. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci* 1997;48:137–57.
- Kanayama K, Osada H. The yield of abnormal unfertilized eggs observed after repeated gonadotrophin-induced ovulation. *J Int Med Res* 2000;28:24.
- Laborde NP, Wolfsen AR, Odell WD. Short loop feedback system for the control of follicle stimulating hormone in the rabbit. *Endocrinology* 1981;108:72–5.
- Lebas F, Theau-Clément M, Remy B, Drion P, Beckers JF. Production of Anti-PMSG Antibodies and its

- relation to the productivity of rabbit does. *World Rabbit Sci* 1996;4:57–62.
- Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskeep EK. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J Anim Sci* 1986;63:176–83.
- Levi-Setti PE, Cavagna M, Bulletti C. Recombinant gonadotrophins associated with GnRH antagonist (cetrorelix) in ovarian stimulation for ICSI: comparison of r-FSH alone and in combination with r-LH. *Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol* 2006;126:212–6.
- Lindsell CE, Ratkumar K, Manning AW, Emery SK, Mapletoft RJ, Murphy BD. Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogenology* 1986;5. 167 [abstract].
- López-Béjar M, López Gatiús F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology* 2002;58:1541–52.
- Löseke A, Spaniel-Borowski K. Simple or repeated induction of superovulation: a study on ovulation rates and microvessel corrosion casts in ovaries golden hamsters. *Ann Anat* 1996;178:5–14.
- Lubbadeh WF, Graves CN, Spahr SL. Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows. *J Anim Sci* 1980;50:124–7.
- Magarey GM, Rodger JC, Buist JM, Mate KE. Effects of repeated superovulation and surgical oocyte collection on ovarian response and natural breeding ability of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Reproduction* 2003;125:701–7.
- Marshall VS, Browne MA, Knowles L, Golos TG, Thomson JA. Ovarian stimulation of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) using recombinant human follicle stimulating hormone. *J Med Primatol* 2003;32:57–66.
- Medjdoub N, Forcada F, López M. Embryo production from repeated induction of ovulation in Gigante de España does. *Proceedings of 7th World Rabbit Congress, Valencia, Blasco A (Ed). 2000. Vol. A. p. 191–195.*
- Mehaisen GMK, Vicente JS, Lavara R, Viudes de Castro MP. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci* 2005;90:148–75.

- Mehaisen GMK, Vicente JS, Lavara R. In vivo embryo recovery rate by laparoscopic technique from rabbit does selected by growth rate. *Reprod Dom Anim* 2004;39:347–51.
- Mehaisen GMK, Viudes de Castro MP, Vicente JS, Lavara R. In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology* 2006;65:1279–91.
- Meldrum DR. Blastocyst transfer - a natural evolution. *Fertil Steril* 1999;72(2):216–7.
- MurphyBD, MapletoftRJ, MannsJ, HumphreyWD. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 1984;25:117–25.
- Naik BR, Rao BS, Vagdevi R, Gnanprakash M, AmaARNth D, Rao VH. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. *Anim Reprod Sci* 2005;86:329–38.
- Remy B, Baril G, Vallet JC, Dufour R, Chouvet C, Saumande J. Are antibodies responsible for a decrease superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine folliclestimulating hormone? *Theriogenology* 1991;36: 389–99.
- Renard JP, Garnier V, Parvex IC. Production et congélation de l'embryon de lapin. *Proceedings of 3er Journées de la Recherche Cunicole, Paris, INRA-ITAVI (Ed). 1982. Ed. INRA-ITAVI Communication n8 18.*
- Rosas CA, Alberio RH, Barañao JL, Agüero A, Chaves MG. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. *Ther-iogenology* 1998;49:1257–64.
- Roser JF, Kiefer BL, Evans JW, Neelly DP, Pacheco CA. The development of antibodies to human chorionic gonadotropin following its repeated injections in the cyclic mare. *J Reprod Fertil* 1979;27:173–9.
- Roy F, Combes B, Vaiman D, Crihiu EP, Pobel T, Deletang F. Humoral immune response to Equine Gonadotropin in ewes: association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biol Reprod* 1999;61:209–18.
- Salvetti P, Theau-Clément M, Beckers JF, Hurtaud J, Guérin P, Neto V. Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology* 2007;67:1185–

93.

- Swanson WF, Roth TL, Graham K, Horohov DW, Godke RA. Kinetics of the humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. *Am J Vet Res* 1996;57:302-7.
- Takagi M, Kim IH, Izadyar F, Hyttel P, Bevers MM, Dieleman SJ. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reproduction* 2001;121(6):941-51.
- Tsiligianni T, Saratsi A, Besenfelder U, Anastasiadis A, Vainas E, Saratsis P, Brem G. The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation. *Theriogenology* 2004;61:989-95.
- Van Blerkom J, Davis P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmatic and spindle organization metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod* 2001;16(4):757-64.
- Van Cappellen WA, Kramer P, van Leeuwen ECM, de Leeuw R, de Jong FH. Induction of superovulation in cyclic rats by administration of decreasing doses of recombinant follicle stimulating hormone (Org32489). *Hum Reprod* 1997;12:224-30.
- Wilson JM, Jones AL, Moore K, Looney CR, Bondioli KR. Superovulation of cattle with recombinant-ADN bovine follicle-stimulating-hormone. *Anim Reprod Sci* 1993;33(1-4):71-82.
- Yang S, Hea X, Hildebrandt TB, Jewgenowb K, Goeritz F, Tang X. Effects of rhFSH dose on ovarian follicular response, oocyte recovery and embryo development in rhesus monkeys. *Theriogenology* 2007;67:1194-201.
- Zelinski Wooten MB, Hutchison JS, Hess DL, Wolf DP, Stouffer RL. Follicle-stimulating-hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotropin-releasing-hormone antagonist-treated monkeys. *Hum Reprod* 1995;10(7):1658-66.

Experimento 3.2

3.2. Effect of superovulation treatment on rabbit oocyte ATP concentration and developmental competence

3.2.1. Abstract

Ovarian stimulation protocols are usually used to increase the number of oocytes collected. In rabbits, superovulation protocols have been performed widely with eCG or FSH. It would be very useful to determine how oocyte quality may be affected by these superovulation procedures. There is a high correlation between oocyte ATP concentration and developmental competence of the resulting embryo. The aim of this study was, in a first phase, to evaluate the effect of FSH origin and administration protocols on oocytes ATP content. Rabbit does were randomly distributed in four groups: Control group (non-superovulated females), rhFSH3 group: females were injected, every 24 hours during three days, with 0.6 ml of rhFSH diluted in PVP; pFSH3 group: females were injected every 24 hours during three days with 11.4 µg of pFSH diluted in PVP; and pFSH5 group: females were injected twice a day for five days with 11.4 µg of pFSH diluted in saline serum. In a second phase, the effect of pFSH5 protocol on developmental potential was evaluated. Developmental competence of oocytes from control and pFSH5 group was examined. Differences among superovulation treatments were found in ATP levels. In pFSH5 group, ATP level was significantly lower than others groups (5.63 ± 0.14 for pFSH group vs. 6.42 ± 0.13 and 6.19 ± 0.15 for rhFSH3 and pFSH3, respectively; $P < 0.05$). In a second phase, when females was treated with pFSH5 protocol, only a 24.28% of ova developing into hatched blastocysts after in vivo fertilization, compared to an average of 80.39% for control group ($P < 0.0001$). A negative effect on oocyte quality have been observed in pFSH5 group in ATP production, it is possible that, after this superovulation treatment, the oocyte metabolism would be affected.

3.2.2 Introduction

Rabbits are frequently used for studies in reproductive biotechnology and genetic modeling. Thus, oocyte recovery is essential for a wide variety of assisted reproductive technologies and associated with them, ovarian stimulation protocols are usually used to increase the number of oocytes collected. In rabbits, superovulation protocols have been performed widely with eCG or FSH (Kauffmann *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2007; Cortell *et al.*, 2008; Viudes de Castro *et al.*, 2009; Viudes de Castro *et al.*, 2010). Nevertheless, the recovery efficiency and oocyte quality of these superovulation treatments are highly variables. One of the causes of the variability in the response after gonadotrophins stimulation may be related to the administration protocol: whereas a single eCG injection is enough to induce superovulation, FSH, due to its shorter lifespan (Rose *et al.*, 2000), must be administered at least twice daily for three days. However, in order to limit animal manipulation, superovulation treatments with FSH diluted in polyvinylpyrrolidone (PVP) solutions have been tested and have resulted in good superovulation response in distinct species, including rabbits (Kanayama *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2006; Cortell *et al.*, 2008; Viudes de Castro *et al.*, 2009; Viudes de Castro *et al.*, 2010).

In addition, when using FSH isolated from pituitary gland, LH:FSH ratio is unknown, which may result in a variable response to superovulation treatments. In rabbits, the effect of LH on superovulation has been studied using both porcine purified FSH (Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007) and human recombinant FSH (Cortell *et al.*, 2008; Viudes de Castro *et al.*, 2009; Viudes de Castro *et al.*, 2010). In all cases, superovulatory response has been achieved; however, it would be very useful to determine how oocyte quality may be affected by these superovulation procedures.

Oocyte quality determination is critical for most human and animal assisted reproductive technologies. Detrimental effects of superovulation on oocyte quality are often observed (Moor *et al.*, 1985; Blondin *et al.*, 1996; Ertzeid and Storeng, 2001; Van der Auwera and D'Hooghe, 2001). Developmental competence is acquired during folliculogenesis as the oocyte grows and during the period of oocyte maturation (Rodrigues *et al.*, 2008). Probably, alterations in oocyte quality could be related to a failure in its maturation process. It is well known that organelle and chromosome

redistribution are necessary steps in oocyte maturation and meiosis resumption (Ferreira *et al.*, 2009); indeed, metabolic, structural and numerical defects have been associated with pre-ovulatory maturational failure for the oocyte and premature arrest or abnormal development for the embryo (Van Blerkom *et al.*, 1995). While it seems that oxidative metabolism is the primary source of energy production during oocytes maturation (Krisher, 2004), mitochondria, by means of their ability to generate ATP, have a central role in the normality of early mammalian development. In order to evaluate embryo and oocytes competence, the ATP concentration and mitochondrial membrane potential in oocytes has been widely studied in different species, showing a high correlation between oocyte ATP concentration and developmental competence of the resulting embryo (Van Blerkom *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001; Cummins, 2000; Van Blerkom, 2004; Tamassia *et al.*, 2004).

The aim of this study was the assessment of oocytes ATP content to evaluate the effect of FSH origin and administration protocols on oocyte quality.

3.2.3. Material and Methods

The research was carried out at the experimental farm of the Centro de Investigación y Tecnología Animal (Segorbe, Castellón). The experiments were approved by the Ethics Committee of the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

All the chemicals unless otherwise states were reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich Química S.A. (Alcobendas, Madrid, Spain). The experiment was carried out in the Animal Technology Center (CITA-IVIA, Spain).

Superovulation treatment and ovulation induction

In the first phase of this study, seventy-three rabbit does were randomly distributed in four groups:

-Control group: non-superovulated, females were injected every 24 hours during three days, with 0.4 mL of 30% polyvinylpyrrolidone (PVP, Molecular weight, 40000) in distilled water;

-rhFSH3 group: females were injected, every 24 hours during three days, with 0.6 µg of rhFSH (Gonal-F® 75, Serono, Italy) diluted in 0.4 mL of 30% PVP;

-pFSH3 group: females were injected every 24 hours during three days with 11.4 µg of pFSH (Stimufol®, Reprobiol, Belgium) diluted in 0.4 ml of 30% PVP;

-pFSH5 group: after dissolving the hormones in physiological saline to a final concentration of 18 µg/ml of porcine FSH (Stimufol®, Reprobiol, Belgium), females were injected twice (12 hours intervals) 0.25 ml on day 1, twice 0.5 ml on day 2 and only one injection of 0.25 ml on morning day 3.

All females were induced to ovulate, 24 hours after the last injection, with 2 µg of Buserelin Acetate (Suprefact, Hoechst).

Oocyte recovery

Does were killed 14 h after ovulation induction and the reproductive tract was immediately removed. Oocytes were recovered by perfusion of each oviduct with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS). Collected liquid was poured in Petri dishes and scored under stereo microscope. Cumulus-oocytes complexes were localized and only those with homogeneous cytoplasm and compacted cumulus were selected to perform the ATP analysis.

The number of follicles with scare ovulation was recorded to estimated the ovulation rate and number of recovered and normal oocytes were recorded by female.

ATP measurement

Selected COCs were suspended in 0.5 % of hyaluronidase in DPBS in order to remove cumulus-cells. After remove that mechanically, the oocytes of each females were randomly distributed in three groups: in the first group (Group 25°C-0h), ATP was measured immediately after recovering in fresh oocytes at room temperature, in the second group, ATP was measured after culture oocytes during two hours at 25°C (Group 25°C-2h). Finally, in the third group, ATP measures were done after culture oocytes during two hours at 38.5°C and 5% CO₂ (Group 38.5°C-2h).

Concentration of ATP was performed using a commercial assay kit based on the luciferin-luciferase reaction (Bioluminescent Somatic Cell Assay Kit, Fl-ASC; Sigma) following the technique described by Rieger [23] and the manufacturer's recommendations. Briefly, two oocytes in 50 ml of

PBS were transferred into 5 mL plastic tubes equilibrated on ice (0°C). One hundred microliters of ice-cold somatic cell reagent (FL-SAR reagent) were then added to the oocytes and incubated for 5 min on ice. Next, 100 ml of diluted ice-cold assay mix (FL-AAM reagent; 1:25 with ATP assay mix dilution buffer, FL-AAB reagent) was added, and the tubes were kept for an additional 5 min at room temperature in the dark. The solution was then transferred into appropriate plastic tubes fitted for the high-sensitivity (0.01 pmol) luminometer (Bioluminat Junior; Berthold, Wildbad, Germany) and luminescence was measured. To obtain simultaneous measurements of samples, a set of tubes with oocytes was measured once and again in reverse order. The mean of these two values expressed in Relative Light Unit was calculated to establish our final value. A seven-point standard curve (0–6 pmol/tube) was determined and, at every 20 oocytes, a negative control was run. The ATP content was calculated using the formula derived from the linear regression of the standard curve.

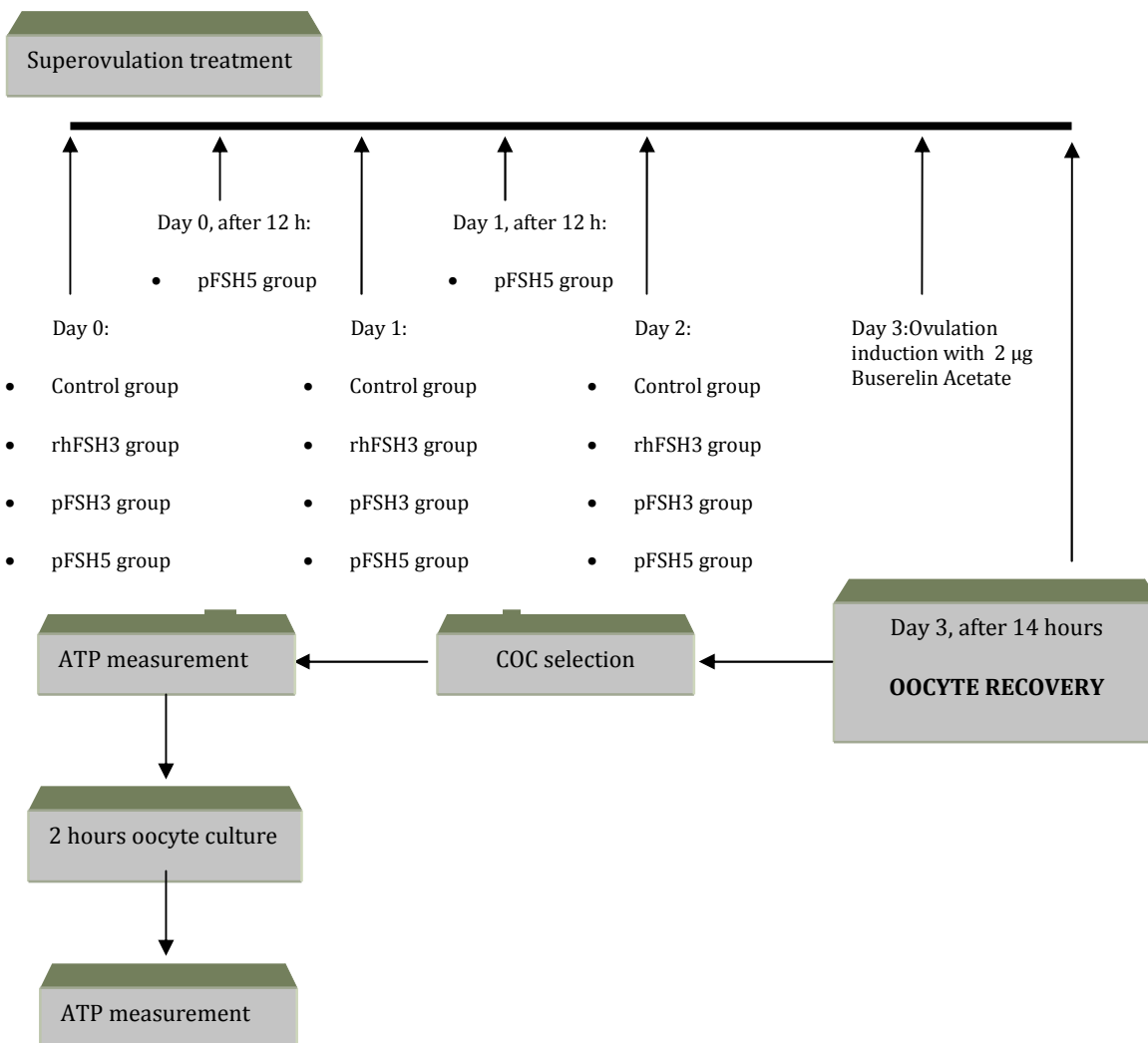


Figure 8. Experimental design resume

In the second phase of the study, developmental competence of oocytes from control and pFSH5 superovulation group was examined.

Twenty four does were inseminated and ovulation was induced with 2 mg buserelin acetate (Suprefact; Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, Spain) given intramuscularly 24 h after the last injection.

Presumptive zygotes were collected 22 to 24 h after artificial insemination. A total of 351 presumptive zygotes (155 control and 196 superovulated) were washed twice in DPBS with 2 g BSA/l and placed into culture dishes in 1 ml of HAMS F12 supplemented with 20% fetal calf serum. The cultures were maintained for 78h at 38.5°C in humidified 5% CO₂ in air and the development to blastocyst was recorded.

Statistical analyses

The effect of superovulation treatment on the ovulation rate and recovered oocytes were analyzed by a General Linear Model Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MO, USA). Females which did not ovulate were eliminated from study.

The effect of superovulation treatment (control, rhFSH3, pFSH3, pFSH5), the culture, the temperature and its interaction (Groups 0h, 2h-25°C and 2h-38.5°C) were used as fixed effects on the oocytes ATP content. These effects were analyzed by a General Linear Model Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MO, USA).

The effect of superovulation (control and pFSH5) on the developmental competence was compared with General Linear Mixed Model (GLIMMIX) procedure of the Statistical Analysis System (SAS Inc. Cary, NC, USA). Treatments (pFSH5 superovulation or control group) were considered fixed effects in the model, while superovulation session and culture session were regarded as random effects. A binomial distribution with a logit-link function was used. Means were separated using Fisher's protected least significant difference, with treatment effect declared significant at $P < 0.05$.

For ease of interpretation, means and standard errors shown in the table 3 are presented on the scale of the data (logit scale).

3.2.4. Results

In the first phase of the study, a total of seventy three does were treated, five females were rejected for failure in ovulation induction. The ovulation rate and the number of recovered oocytes in the pFSH5 group were significantly higher than the other groups ($P < 0.05$, Table 3.2.1); while rhFSH3 group showed ovulation rate and number of recovered oocytes significantly higher than control group, pFSH3 group results were similar to control and rhFSH3 group.

Table 3.2.1. Effect of superovulation treatment on ovulation rate and number of oocytes recovered (LSM±Standard error)

Treatment	Females	Ovulation rate	Recovered oocytes
Control	22	10.7±2.0 ^a	8.6±1.9 ^a
pFSH3	18	11.1±2.2 ^{ab}	9.5±2.1 ^{ab}
rhFSH3	18	16.6±2.2 ^b	15.3±2.1 ^b
pFSH5	10	34.4±2.9 ^c	25.1±2.9 ^c

Values with different superscripts in the same column are statistically different ($P < 0.05$)

On the other hand, as shown in table 3.2.2, differences among superovulation treatments were found in ATP levels. In pFSH5 group, ATP level was significantly lower than others groups (5.63 ± 0.14 for pFSH group vs. 6.42 ± 0.13 and 6.19 ± 0.15 for rhFSH3 and pFSH3, respectively; $P < 0.05$) but similar to the control group.

Regarding the culture effect on ATP contents, oocytes cultured 2 h at 25°C or 38.5°C presented higher ATP level than those measured immediately after recovering (6.17 ± 0.16 and 7.08 ± 0.13 for 2h at 25°C and 2h at 38.5°C respectively, vs 4.95 ± 0.10 for 0h; $p < 0.05$, Table 3.2.2). In addition, ATP level in 38.5°C cultured oocytes group was significantly higher than in 25°C cultured oocytes group.

Table 3.2.2. Effect of superovulation treatment and culture temperature on ATP content (LSM±Standard error)

	Group	N	ATP content (pmol)
Superovulation treatment	Control	146	6.03±0.17 ^{ab}
	rhFSH3	245	6.42±0.13 ^b
	pFSH3	161	6.19±0.15 ^b
	pFSH5	242	5.63±0.14 ^a
Culture	0 hours	393	4.95±0.10 ^a
	2 h at 25°C	153	6.17±0.16 ^b
	2 h at 38°C	248	7.08±0.13 ^c

Values with different superscripts in the same column are statistically different (P < 0.05)

In the second phase of the study, the developmental competence of pFSH5 superovulated oocytes and control group was showed on Table 3.2.3. The pFSH5 superovulation treatment have a substantial influence on the developmental ability of oocytes, with a 24.28% of ova developing into hatched blastocysts after in vivo fertilization vs a 80.39% for control group (P<0.0001). Considering only the fertilized ova, the developing rate for pFSH5 group was significantly lower than control group (79.04 % vs 95.16 % for pFSH5 and Control group, respectively).

Table 3.2.3. Effect of pFSH5 superovulation treatment on developmental competence (LSM±Standard error)

Group	N	HR (%)	DR (%)
Control	155	80.39±6.97 ^a	95.16±2.48 ^a
pFSH5	196	24.28±7.86 ^b	79.04±7.92 ^b

N: number of presumptive zygotes; **HR:** Hatching rate=(hatched blastocyst/cultured blastocyst) x 100; **DR:** Deevaluation rate=(hatched blastocyst-oocytes)/cultured embryos) x 100.

Values with different superscripts in the same column are statistically different (P < 0.05)

3.2.5. Discussion

Several studies revealed that administration of exogenous gonadotropin yields high numbers of oocytes and embryos but may result in a decrease in its developmental competence (Kauffmann *et al.*, 1998, Mehaisen *et al.*, 2005; Moor *et al.*, 1985; Ertzeid y Storeng, 2001; Blondin *et al.*, 1996; Fujimoto *et al.*, 1974). Nevertheless, the way in which gametes are altered by gonadotropins could respond to different origins, including an alteration in oocyte maturation or in its energy metabolism. Mitochondria, by means of its ability to generate ATP by oxidative phosphorylation, are the main organelle involucrated in energy regulation (Ramalho-Santos *et al.*, 2009).

Given that it has been observed that FSH in absence of LH could induce superovulatory response in rabbit does both using purified porcine FSH or recombinant human FSH (Salveti *et al.*, 2007; Cortell *et al.*, 2008; Viudes de Castro *et al.*, 2009), in the present study, the effect of these hormonal preparations on ovulation rate and oocyte quality was compared. Regarding to superovulatory response, both purified pFSH administered in five injections, twice a day (pFSH5), and rhFSH dissolved in PVP administered in three injections, once a day for three days (rhFSH3), resulted in a higher ovulation rate than control group. However, in spite of their ability to induce a superovulation response, while rhFSH reached similar results to those reported previously with oFSH, pFSH and rhFSH, increasing two times the ovulation rate and the number of oocytes or embryos recovered in superovulated does (Kauffmann *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007; Viudes de Castro *et al.*, 2009), the pFSH5 treatment, showed a ovulation rate 3.5 times higher than control group. Despite an increase in the number of oocytes produced per female, when animals are treated with pFSH5 protocol, the blastocyst developmental rate per oocyte was significantly decreased compared to control females.

On the other hand, when pFSH was administered one a day for 3 days, no superovulatory response was observed. The poorer ovarian response in pFSH3 group at the concentration used in the present work may be affected by the treatment schedule or by the hormone vehicle. This idea would be confirmed by our previous studies (data not shown) in which rhFSH applied in saline serum twice a day for five days resulted in a higher ovulation rate than applied in PVP one a day for

three days. Thus, these results may indicate that the FSH amount reaching the ovary with the dose of pFSH used in the present work is less when the hormone is administered one a day diluted for three days in PVP than when is administered twice a day for five days diluted in saline serum. Although PVP has been used as hormone vehicle successfully in rabbit does previously (Hashimoto *et al.*, 2004; Cortell *et al.*, 2005; Viudes de Castro *et al.*, 2009; Kanayama *et al.*, 1992), to our knowledge, it has not been compared to the same hormonal dose administrated in saline serum. However, it has been noted that the reduction of injection number using PVP as vehicle may affect the ovarian response after superovulation (D'Alessandro *et al.*, 2001; Lopes da Costa *et al.*, 2001). In order to determine the effect of these superovulation treatments on oocyte quality, ATP amount in recovered oocytes was determined. It has been described previously that mitochondrial dysfunction and ATP content may be related to developmental competence in oocytes and embryos (Van Blerkom *et al.*, 1995; Thouas *et al.*, 2004; Nagano *et al.*, 2006). Although difference in ATP level was non significant when compared to control group, significant differences in ATP content were found between different superovulatory treatments. Our data suggest that the reduced level of ATP in pFSH5 produced oocytes may reflect a minor mitochondrial activity which plays a critical role for acquisition of developmental competence in the oocyte. It is well known that oocyte maturation process depends on FSH and LH stimulation and oocyte-follicle interaction (Hillier, 2009) and superovulation treatments could affect to granulosa cells activity or accelerate follicular growth (Blondin *et al.*, 1996). In fact, an effect on ATP content by superovulation treatment it has been described previously both in mouse (Combelles y Albertini, 2003) and hamster (Lee *et al.*, 2006).

Otherwise, how ATP levels are affected during oocyte maturation seems to be still unclear and seems to be very specie-specific; it has been observed that in vitro maturation and maturation conditions may impact on mitochondrial activity in rabbits (Kanaya *et al.*, 2007), mouse (Combelles y Albertini, 2003), cows (Stojkovic *et al.*, 2001; Nagano *et al.*, 2006), gilts (Brevini *et al.*, 2005) or cats (Freistedt *et al.*, 2001).

On the other hand, ATP levels increased significantly after culturing during two hours; however, results were higher in those oocytes cultured at 38.5°C than those cultured at 25°C. This

ATP variation with the incubation temperature suggest that 38.5°C might allow the oocytes to recover ATP synthesis more quickly than 25°C. The low ATP contents when oocytes were recovered may due to the releasing of ATP under stress conditions and its degradation by ecto-ATPases sited in cell surface (Joseph *et al.*, 2003; Schwiebert and Zsembery, 2003); in fact, this would be according to this observed by Tamassia *et al.* (2004) in cows, who detected lower ATP levels in oocytes obtained from slaughterhouse than in oocytes obtained from OPU; probably due to the more stressful conditions and transport when they are recovered from a sacrificed female. Moreover these oocytes achieved ATP contents similar to oocytes from OPU after culture them.

Finally, our results shown that porcine FSH administered in five doses, every 12 hours, may induce greater response in ovulation rate than recombinant human FSH dissolved in PVP and administered in three doses, every 24 hours. Otherwise, a negative effect on oocyte quality has been observed in pFSH5 group in ATP production. Furthermore, *in vivo* fertilization rate and *in vitro* developmental competence for pFSH5 treatment were considerably lower than the results of control group. We hypothesize that the reduced level of ATP may reflect reduced activity of mitochondria which play a critical role for acquisition of developmental competence, and this could explain the lower proportion of development to hatching blastocyst in pFSH5 group in the present work.

3.2.6. References

- Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*. 1996;46:1191-203.
- Brevini TAL, Vassena R, Francisci C, Gandolfi F. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biol Reprod* 2005;72:1218-1223.
- Combelles MH, Albertini DF. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. *Biol. Reprod* 2003;60:812-821.
- Cortell C, Vicente JS, Mocé E, Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP. Efficiency of repeated *in vivo* oocyte and embryo recovery after rhFSH treatment in rabbits. *Reprod Dom Anim* 2008;45:155-159.
- Cummins J. The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. *Reprod BioMed Online* 2002;4:176-182.
- D'Alessandro AG, Martemucci G, Colonna MA, Borghese A, Terzano MG, Bellitti A. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Anim Reprod Sci* 2001;65:255-64.
- Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 2001;16:221-225.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009;71:836-848.
- Freistedt P, Stojkovic P, Wolf E, Stojkovic M. Energy status of nonmatured and in vitro-matured domestic cat oocytes and of different stages of in vitro-produced embryos: enzymatic removal of the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts. *Biol Reprod* 2001;65: 793-798.

- Fujimoto S, Pahlavan N, Dukelow WR. Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J Reprod Fertil* 1974;40:177-181.
- Hashimoto S, Kuramochi T, Aoyagi K, Takahashi R, Ueda M, Hirao M, Kamei M, Kitada K, Hirasawa K. Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation treatment. *Exp Anim* 2004;53:395-397.
- Hillier SG. Paracrine support of ovarian stimulation. *Mol H Reprod* 2009;12:843-850.
- Joseph SM, Buchakjian MR, Dubyak GR. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* 2003;278:23331-22342.
- Kanaya H, Hashimoto S, Teramura T, Morimoto Y, Matsumoto K, Saeki K, Iritani A, Hosoi Y. Mitochondrial dysfunction of in vitro grown rabbit oocytes results in preimplantation embryo arrest after activation. *J Reprod Devel* 2007;53:631-637.
- Kanayama K, Endo T, Sakuma Y. Simplification of superovulation induction in rabbits by means of human menopausal gonadotrophin dissolved in polyvinylpyrrolidone. *J Vet Med Sci* 1992;39:798-800.
- Kanayama K, Sankai T, Nariai K, Endo T, Sakuma Y. Simplification of superovulation induction by using polyvinylpyrrolidone as a solvent for FSH in rabbits. *J Vet Med Sci* 1994;56:599-600.
- Kauffman RD, Schmidt PM, Rall WF, Hoeg JM. Superovulation of rabbits with FSH alters in vivo development of vitrified morulae. *Theriogenology* 1998;50:1081-1092.
- Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004;82:E14-E23.
- Lee ST, Oh SJ, Lee EJ, Han HJ, Lim JM. Adenosine triphosphate synthesis, mitochondrial number and activity, and pyruvate uptake in oocytes after gonadotropin injections. *Fertil Steril* 2006;86:1164-1169.
- Lopes da Costa L, Chagas e Silva J, Robalo Silva J. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology* 2001;56:65-77.

- Mehaisen GM, Vicente JS, Lavara R, Viudes-de-Castro MP. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci* 2005;90:175-184.
- Mehaisen GMK, Viudes de Castro MP, Vicente JS, Lavara R. In vitro and in vivo vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*.2006;65:1279-1291.
- Moor RM, Osborn JC, Crosby IM. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J Reprod Fertil* 1985;74:167-172.
- Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote* 2006;14:299-304.
- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stemcells. *HumReprod Update* 2009;15:553-572.
- Rieger D. Batch analysis of the ATP content of bovine sperm, oocytes and early embryos using a scintillation counter to measure the chemiluminiscence produced by the Luciferin-Luciferase reaction. *Analytical Biochemistry* 1997;246:67-70.
- Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini DF. Oogenesis: Prospects and challenges for the future. *J Cell Physiol* 2008;16:355-365.
- Rose MP, Gaines Das RE, Balen AH. Definition ad measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev* 2000;21:5-22.
- Salvetti P, Theau-Clément M, Beckers JF, Hurtaud J, Guerin P, Neto V, Falières J, Joly T. Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology* 2007;67:1185-1193.
- Schwiebert EM, Zsembery A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1615:7-32.

- Stojkovic M, Machado S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves P, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001;64:904-909.
- Tamassia M, Nuttinck F, May-Panloup P, Reynier P, Heyman Y, Charpigny G, Stojkovic M, Hiendleder S, Renard JP, Chastant-Maillard S. In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial ADN and mitochondrial ADN haplogroup. *Biol Reprod* 2004;71:697-704.
- Thouas GA, Trounson AO, Wolvetang EJ, Jones GM. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biol Reprod* 2004;71:1936-1942.
- Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *H Reprod* 1995;10:415-424.
- Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004;128:269-280.
- Van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod* 2001;16:1237-43.
- Viudes-de-Castro MP, Cortell C, Mocé E, Marco-Jiménez F, Joly T, Vicente JS. Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology* 2009;72:655-662.
- Viudes-de-Castro MP, Cortell C, Vicente JS. Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. *Theriogenology* 2010;74:1623-1628.

Esperimento 3.3

3.3. Efficiency of Repeated In Vivo Oocyte and Embryo Recovery After rhFSH treatment in Rabbits

3.3.1. Abstract

This study aims to assess the efficiency of in vivo oocyte and embryo recovery after a recombinant human FSH (rhFSH) treatment in rabbit does. Females were distributed in two experimental groups: donor does were treated with rhFSH (superovulation group) for 3 days prior to artificial insemination (embryo recovery) or ovulation induction (oocyte recovery) and does without treatment remained as the control group. Mature oocytes or embryos were collected with the laparoscopy technique 16 h after ovulation induction (oocytes) or 72 h after artificial insemination (embryos). Up to four recoveries were performed with each doe. Recovery efficiencies differed significantly between embryos (84%) and oocytes (58%). Yet, the recovery rates for the superovulation and control groups did not differ. The rhFSH group was associated with a significant increase ($p < 0.05$) in the number of oocytes and embryos recovered in comparison with the control group (10.2 ± 1.0 and 14.3 ± 1.2 vs 6.0 ± 2.7 and 8.4 ± 2.3 for oocytes and embryos, respectively). Results from this study indicate that repeated in vivo oocyte and embryo recovery from rhFSH superovulated does maximizes the number of oocytes or embryos collected from the same female.

*This study has been published in *Reprod Dom Anim*; 2010. 45:155-159.

3.3.2. Introduction

Embryo production and cryopreservation in rabbits are frequently used for genetic resource bank purposes, especially in those belonging to the transgenic type. However, oocytes are seldom cryopreserved because of the poor results obtained after cryopreservation and fertilization processes (Vincent *et al.* 1989; Cai *et al.* 2005). Nevertheless, oocyte recovery is essential for some reproductive technologies including intracytoplasmic sperm injection, rabbit cloning or interspecific nuclear transfer.

To optimize the use of these reproductive technologies, as many embryos and oocytes as possible must be collected; hence, superovulation treatments are usually administered. Both eCG and FSH have been used to induce superovulation in rabbit does (Kauffman *et al.* 1998; Mehaisen *et al.* 2005; Salvetti *et al.* 2007). Whereas a single eCG injection is enough to induce superovulation, FSH must be administered at least twice daily for 3 days. However, animal manipulation can be minimized if FSH is dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP), which permits longer intervals between treatments (one injection every 24 h) given its ability to prolong the clearance rate in vivo of many molecules by binding and stabilizing them. Superovulation treatments with FSH diluted in PVP solutions have been tested and acceptable superovulation responses have been reported in distinct species, including rabbits (Kanayama *et al.* 1994; Hashimoto *et al.* 2004; Mehaisen *et al.* 2006). Nevertheless, results of superovulation treatments vary, and one of the reasons for this may be the variable LH : FSH ratio, when preparations isolated from the pituitary gland are used. In rabbits, the effect of LH on superovulation has been studied using porcine FSH obtaining highly variable results (Hashimoto *et al.* 2004; Salvetti *et al.* 2007). Recombinant FSH may yield a better superovulatory response, as this is a LH-free FSH.

Various techniques have been developed to collect oocytes and embryos. In rabbits, embryo or oocyte collections are usually performed post-mortem. Thus, each female can be used only once. Yet, when consecutive recoveries from the same donor are required, recoveries must be performed in vivo.

Rabbit oocytes in the germinal vesicle are usually retrieved by follicle aspiration or slicing, even though laparoscopic-guided oocyte recovery has also been described (Asakawa *et al.* 1988). Recovery of mature oocytes (Metaphase II oocytes) from rabbits is of particular importance, given the poor efficiency of the *in vitro* maturation procedure for this species. Although the oocytes are usually collected post-mortem by flushing the oviducts and uterine horns, mature oocytes have also been collected *in vivo* by both laparotomy (Yang *et al.* 1992; Liu *et al.* 2004) and laparoscopy (Besenfelder *et al.* 2000), but these techniques are not commonly used. Nevertheless, *in vivo* embryo recovery is frequently carried out both with laparotomy (Kauffman *et al.* 1998; Forcada and López 2000) and with laparoscopy (Besenfelder *et al.* 1998; Mehaisen *et al.* 2006). Further, rabbit embryo recovery has even been achieved using the same female repeatedly (Forcada and López 2000; Mehaisen *et al.* 2006). As a technique of choice for multiple oocyte or embryo collections in rabbits, laparoscopy not only allows for free optic access to the reproductive organs and manipulation *in situ* but it also guarantees minimal invasion through a small entry into the peritoneal cavity (Besenfelder *et al.* 1998). The aim of this study was to assess the efficiency of *in vivo* oocyte and embryo recovery using laparoscopy after rhFSH treatment in rabbit does.

3.3.3. Material and Methods

The experiment was approved by the Ethical Committee of the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

Animals

Sixty-three sexually mature New Zealand White does were used. All the animals were kept individually in flat deck cages under 16 h light/8 h dark conditions in the experimental farm of the Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA-IVIA, Spain). The does were fed with a commercial diet *ad libitum* and had free access to water.

Reagents and media preparation

All the chemicals, unless otherwise stated, were reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich Química S.A. (Alcobendas, Madrid, Spain).

The collection media consisted of Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) with 0.2% Bovine Serum Albumin (BSA), supplemented with penicillin and streptomycin (10 000 IU and 10 mg/l, respectively).

For the hormone solution, 5.5 lg of rhFSH (Gonal- F® 75, Serono, Italy) was diluted along with 3.6 ml 30% (w : v) PVP solution (MW 40 000) in distilled water.

Superovulation treatment, ovulation induction and artificial insemination

Does were randomly distributed in two groups:

(1) rhFSH group: does were treated intramuscularly every 24 h for 3 days with the 0.4 ml hormone preparation.

(2) Control group: does were treated intramuscularly every 24 h for 3 days with 0.4 ml of 30% PVP solution (hormone-free).

On day 4, and 24 h after the last rhFSH treatment, embryo donors were inseminated with 0.5 ml of fresh heterospermic pool, selected with a motility criteria and diluted 1 : 5 with a Tris-citric-glucose diluent (Vicente *et al.* 2004). Immediately after insemination, ovulation was induced in the does with an intramuscular injection of 2 µg Buserelin Acetate (Suprefact, Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, Spain). Ovulation was also induced in oocyte donors (artificial inseminations were not performed).

Embryo and oocyte recovery

Does were subjected up to four recovery cycles. Between each recovery cycle (cycle 1-3), females were allowed to recover for 1 month. In addition, between the third and the fourth cycle, females were allowed to give birth and to recover for 3 months. Both types of recovery (oocyte or embryo) could be performed in each female.

Embryos were collected 72 h post-insemination, while oocytes were collected 16 h after ovulation induction. The embryo and oocyte recoveries were performed *in vivo* using the ventral midline laparoscopy technique as described by Besenfelder *et al.* (1998). The type of recovery (oocyte or embryos) was alternated in the does in order to randomize the effect.

To sedate the does during surgery, anaesthesia was administered by an intramuscular injection of 16 mg xylazine (Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Germany), followed by an intravenous injection of ketamine chlorohydrate at the rate of 1.2 ml / kg body weight (Imalgene®, Merial, S.A., Lyon, France). Then, the abdominal region was shaved and disinfected. Animals were placed on an operating table, head down and at a 45-degree angle. After that, CO₂ was used to insufflate does to prevent damage to the internal organs and to facilitate access to the ovaries. Endoscope and non-traumatic forceps were inserted into the abdominal cavity through a small incision caudal to the sternum. The ovary was located and the ovulation rate was calculated by counting the number of corpora lutea in each ovary. For embryo or oocyte collection, a catheter was first introduced in the inguinal region with an epidural needle and was then inserted in the oviduct through the infundibulum. Once the catheter was fastened inside the oviduct, each oviduct was perfused with 10 ml of pre-heated collection media, followed by the perfusion of each uterine horn with 50 ml of this medium. The uterine content was collected from the vagina using a sterile flushing catheter with foley end (Minitube, Tiefenbach, Germany) connected to a vacuum pump. The uterine content was retrieved in a flask, and it was then transferred into sterile Petri dishes for examination under a stereo microscope. The embryos and oocytes were counted and evaluated morphologically, following the International Embryo Transfer Society criteria of classification.

Two recovery variables were recorded: (i) the ovulation rate (calculated as the number of corpora lutea in both ovaries) and (ii) the number of embryos or oocytes recovered. The recovery rate was calculated as the number of embryos or oocytes recovered divided by the number of corpora lutea, multiplied by 100. calculated as the number of embryos or oocytes recovered divided by the number of corpora lutea, multiplied by 100.

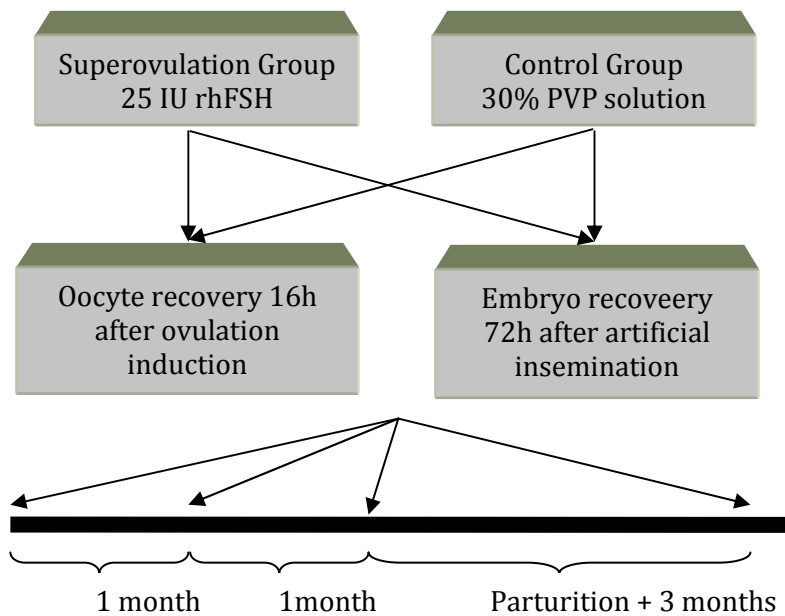


Figure 9. Experimental design resume

Statistical analyses

The effect of superovulation treatment on the ovulation rate and recovery efficiency (number of embryos or oocytes per ovulation rate) was analysed by ANOVA using the General Linear Models (GLM) procedure of Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MO, USA). The fixed effects considered were the type of recovery (embryos or oocytes), the number of cycles (first, second, third or fourth cycle), the specific treatment (rhFSH or control) and their interactions. Further, a covariance analysis including ovulation rate as covariable had initially been included in the model. The multiple comparisons method used in GLM was Tukey's significant difference procedure (HSD).

3.3.4. Results

In total, 205 laparoscopies were performed. Nine cases were rejected because of the problems derived from the recovery technique (partial perfusion, presence of urine in the perfusion process, etc.) and 11 for failure in ovulation induction. Therefore, only 185 laparoscopies were considered for the analysis of data, 73 to recover oocytes and 112 to collect embryos. During the 7 months of the

experimental period, 13 does were eliminated because of pathological problems. The average number of recoveries performed per doe was 3.09 ± 0.1 .

Table 3.3.1. Ovulation rate and number of embryos and oocytes collected along the cycle repetitions.

LSM (Last square means \pm standard error)

Cycle order	Control			rhFSH		
	N	OR	RR	N	OR	RR
1	12	9.7 \pm 0.6	72.3 \pm 0.1	49	22.8 \pm 1.4 ^a	67.8 \pm 0.0
2	10	10.2 \pm 0.7	77.1 \pm 0.1	42	18.3 \pm 1.5 ^{ab}	75.2 \pm 0.0
3	5	9.0 \pm 0.9	75.9 \pm 0.2	36	15.6 \pm 1.6 ^b	79.5 \pm 0.0
4	5	9.8 \pm 0.9	67.4 \pm 0.2	26	15.2 \pm 1.9 ^b	88.9 \pm 0.1
Total	32	9.7 \pm 0.4	73.2 \pm 0.1	153	17.9 \pm 0.8	77.8 \pm 0.0

N: number; OR: Oocyte Rate; RR: Recovery Rate; ^{ab}Values in the same column with different superscripts are statistically different ($p < 0.05$).

The ovulation rate in the rhFSH group was higher than in the control group (17.9 ± 0.8 vs 9.7 ± 0.4 , respectively; $p < 0.05$, Table 3.3.1). Whereas the ovulation rate in the control group remained similar throughout the four cycles, the number of females, which responded to the rhFSH treatment diminished with each cycle; thus, the ovulation rate in the rhFSH group dropped as well, with the ovulation rate in the first cycle being 22.8 ± 1.4 (Table 3.3.1). The recovery efficiency was similar for the four cycles and for the two treatments (control or rhFSH, Table 3.3.1).

The ovulation rate for each recovery type (embryos or oocytes) in the rhFSH group was higher than in the control group (9.5 ± 3.1 vs 19.1 ± 3.1 and 9.7 ± 2.2 vs 16.8 ± 1.1 for oocytes and embryos, respectively; $p < 0.05$, Table 3.3.2). The rhFSH group was also associated with a significant increase ($p < 0.05$) in the number of oocyte and embryo recovered in comparison with the control group (10.2 ± 1.0 and

Table 3.3.2. Ovulation rate and number of embryos and oocytes collected after laparoscopy recovery from the two superovulation treatment groups. LSM (Last square means \pm standard error)

	Oocytes		Embryos	
	Control	rhFSH	Control	rhFSH
Ovulation Rate	9.5 \pm 3.1 ^a	19.1 \pm 3.1 ^b	9.7 \pm 2.2 ^a	16.8 \pm 1.1 ^b
Number Recovered	6.0 \pm 2.7 ^a	10.2 \pm 1.0 ^b	8.4 \pm 2.3 ^a	14.3 \pm 1.2 ^b
Recovery Rate	61.3 \pm 10.4 ^a	58.1 \pm 3.8 ^a	87.9 \pm 6.6 ^b	85.5 \pm 3.3 ^b

^{a,b}Values in the same row with different superscripts are statistically different ($p < 0.05$).

14.3 \pm 1.2 vs 6.0 \pm 2.7 and 8.4 \pm 2.3 for oocytes and embryos, respectively, Table 3.3.2).

Embryo and oocyte recovery efficiencies differed significantly; embryo recovery was more efficient than oocyte recovery (84.5 \pm 3.9 vs. 58.2 \pm 4.6, respectively; $p < 0.05$, Table 3.3.2).

The ovulation rate was not significant as a covariate ($p = 0.7135$). No significant interactions were observed among recovery type. The interactions among number of cycles and treatment groups for the variables analysed were not significant.

Table 3.3.3. Recovery rate along the cycle repetitions. Least square means \pm standard error

	Cycle order	Oocytes	Embryos
Recovery rate (n)	1	45.1 \pm 0.2 ^a (18)	80.0 \pm 0.0 ^b (43)
	2	67.9 \pm 0.2 ^a (14)	81.7 \pm 0.1 ^b (38)
	3	60.7 \pm 0.1 ^a (18)	90.2 \pm 0.1 ^b (23)
	4	64.9 \pm 0.1 ^a (23)	94.9 \pm 0.1 ^b (8)
	Total	58.2 \pm 0.0 ^a (73)	84.5 \pm 0.0 ^b (112)

^{a,b}Values in the same row with different superscripts are statistically different ($p < 0.05$).

3.3.5. Discussion

Differences in ovulation rates between the superovulation and control groups suggest that does did respond to the first rhFSH treatment. However, the number of females, which responded to superovulation induction diminished with repeated treatments. In fact, the ovulation rate for the rhFSH group in the first cycle was 22.8 ± 1.4 , which was slightly lower than the 23.5 to 43 range reported by other authors when FSH treatments were used (Kauffman *et al.* 1998; Mehaisen *et al.* 2006; Salvetti *et al.* 2007). Nevertheless, the ovulation rate for the fourth treatment was 15.2 ± 1.9 , which was a poor response, despite being higher than that of control group (9.8 ± 0.9) (data not shown in tables). This decrease in response after repeated FSH treatments has also been reported by other authors for other species (Swanson *et al.* 1996; Combelles and Albertini 2003; Mehaisen *et al.* 2006). This response is probably attributable to the formation of anti-gonadotrophin antibodies (Lebas *et al.* 1996; Haller *et al.* 2005).

Recovering oocytes with a laparoscopy technique is generally difficult because 16 h after ovulation, oviduct contractibility increases (Salomy and Harper 1971; Spilman *et al.* 1978; Marsafy and Hafez 1981) and the oviduct diameter decreases (Eddy *et al.* 1978; Marsafy and Hafez 1981; Osada *et al.* 1999). Therefore, at the moment of oocyte recovery, it is extremely difficult to insert the catheter without breaking the oviduct wall while increasing pressure with perfusion liquid. In addition, with this technique, some oocytes may be left in the oviducts given their proximity to the oviduct entrance 16 h after inducing ovulation (Hodgson and Pauerstein 1976; Bourdage and Halbert 1988). Most likely, the catheter is inserted deeper into the oviduct, further away from where some of the oocytes are located. In contrast to oocyte recovery, embryo recovery usually takes place 72 h after ovulation, when the oviduct diameter expands. The oviduct wall relaxes and embryos enter the uterine horns, so it is easier to recover all the embryos at 72 h than to collect the oocytes at 16 h.

Although this difference in recovery efficiency could also be attributed to variations in the transport rate between oocytes and embryos, as observed in mares and hamsters (Betteridge and Mitchell 1974; Ortiz *et al.* 1986), it is unlikely in rabbits as previously reported (Hodgson and Pauerstein 1976).

Embryo recovery efficiencies are variable and depend on the physiological status of the does, female line, superstimulation treatment and recovery technique. Using laparoscopy for assistance, transvaginal embryo recovery efficiencies between 49% and 98% have been achieved (Mehaisen *et al.* 2004; Lavara *et al.* 2005). Embryo recovery rates obtained when using laparotomy range between 76% and 100% if females are superovulated (Kauffman *et al.* 1998) and between 74% and 87% when superovulation treatment is not used (Kauffman *et al.* 1998; Forcada and López 2000; Medjdoub *et al.* 2000). On the other hand, post-mortem embryo recovery efficiencies range between 49% and 86% (Lavara *et al.* 2001; Vicente *et al.* 2003; Mehaisen *et al.* 2004; Salvetti *et al.* 2007). Although oocyte collections by laparoscopy have been reported (Besenfelder *et al.* 1998), to our knowledge, recovery efficiencies have not yet been established for oocytes.

Efficiency in embryo recovery did not vary during the cycles, although an increase in the number of females with adhesions in their oviducts and uterine horns was observed as the number of replicates on the same female increased. Forcada and López (2000) observed that after three repeated surgical embryo recoveries, the fourth session seemed to be less efficient. This observation contrasts with our own, which may be the result of more females developing adhesions when laparotomy is used, as this technique is more traumatic and invasive than laparoscopy. In terms of oocyte recovery, the first cycle was characterized by a lower efficiency than the third and fourth cycles. This is most likely because of the difficulty of this technique, as mentioned previously. Proficiency in the recovery of oocytes was enhanced with practice, and the efficiency reached 65%.

When superovulation is induced, the oviductal environment is naturally affected (Suzuki and Tsutsumi 1981; Ertzeid and Storeng 2001; Greve and Callesen 2001). Both egg transport and oviductal contractibility are controlled by oestradiol-17 β and progesterone; so when the concentrations of these hormones change in response to a superovulation treatment, egg transport is altered as well. In fact, superovulatory treatment can accelerate embryo transport in different species (Whyman and Moore 1980; Akira *et al.* 1993; Misra *et al.* 1998), including rabbits (Tsutsumi and Hafez 1974). Nevertheless, these changes did not affect the efficiency in embryo or oocyte recovery in this study, because similar efficiency results were obtained for both superovulated and

control does.

In brief, it is possible to perform repeated oocyte and embryo recovery *in vivo* and maximize the number of oocytes and embryos obtained per female. Recovery of embryos with a laparoscopic technique is more efficient than the recovery of oocytes. In addition, a single doe may be used up to at least four times without altering the recovery efficiency. Finally, recovery efficiency is not affected when females are superovulated; therefore, rhFSH superovulation treatment is useful to obtain the maximum number of oocytes or embryos per female.

3.3.6. References

- Akira S, Sanbuissho A, Lin YC, Araki T, 1993: Acceleration of embryo transport in superovulated adult rats. *Life Sci* **53**, 1243–1251.
- Asakawa T, Ishikawa M, Shimizu T, Dukelow WR, 1988: The chromosomal normality of in vitro-fertilized rabbit oocytes. *Biol Reprod* **38**, 292–295.
- Besenfelder U, Strouhal C, Brem G, 1998: A method for endoscopic embryo collection and transfer in the rabbit. *Zentralbl Veterinarmed A* **45**, 577–579.
- Besenfelder U, Haas C, Brem G, 2000: *Reproduction Technology and Gene Transfer in Rabbits*. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Vol. A, pp. 37–59.
- Betteridge KJ, Mitchell D, 1974: Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *J Reprod Fertil* **39**, 145–148.
- Bourdage RJ, Halbert SA, 1988: Distribution of embryos and 500-microm microspheres in the rabbit oviduct: controls for acute motion analysis during transport. *Biol Reprod* **38**, 282–291.
- Cai XY, Chen GA, Lian Y, Zheng XY, Peng HM, 2005: Cryoloop vitrification of rabbit oocytes. *Hum Reprod* **20**, 1969–1974.
- Combelles CM, Albertini DF, 2003: Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. *Biol Reprod* **68**, 812–821.
- Eddy CA, Balmaceda JP, Pauerstein CJ, 1978: Effect of resection of the ampullary-isthmic junction on estrogen induced tubal locking of ova in the rabbit. *Biol Reprod* **18**, 105–109.
- Ertzeid G, Storeng R, 2001: The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* **16**, 221–225.
- Forcada F, López M, 2000: Repeated surgical embryo recovery and embryo production in rabbits. *Anim Reprod Sci* **64**, 121–126.
- Greve T, Callesen H, 2001: Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod Nutr Dev* **41**, 451–459.
- Haller K, Mathieu C, Rull K, Matt K, Bene MC, Uibo R, 2005: IgG, IgA and IgM antibodies against FSH: serological markers of pathogenic autoimmunity or of normal immunoregulation? *Am J Reprod*

- Immunol **54**, 262–269.
- Hashimoto S, Kuramochi T, Aoyagi K, Takahashi R, Ueda M, Hirao M, Kamei M, Kitada K, Hirasawa K, 2004: Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation treatment. *Exp Anim* **53**, 395–397.
- Hodgson JB, Pauerstein CJ, 1976: Comparison of oviductal transport of fertilized and unfertilized ova after HCG or coitus-induced ovulation in rabbits. *Biol Reprod* **14**, 377–380.
- Kanayama K, Sankai T, Nariai K, Endo T, Sakuma Y, 1994: Simplification of superovulation induction by using polyvinylpyrrolidone as a solvent for FSH in rabbits. *J Vet Med Sci* **56**, 599–600.
- Kauffman RD, Schmidt PM, Rall WF, Hoeg JM, 1998: Superovulation of rabbits with FSH alters in vivo development of vitrified morulae. *Theriogenology* **50**, 1081–1092.
- Lavara R, Mocé L, Mocé E, García ML, Vicente JS, 2001: Vitricación de Embriones en Líneas Seleccionadas de Conejo. *Proc III Congreso Ibérico de Reproducción Animal Oporto Vol. 2*, pp. 409–415.
- Lavara R, Viudes de Castro MP, Mehaisen GMK, Vicente JS, 2005: Eficiencia de la Recuperación *In Vivo* de Embriones de Conejo por Laparoscopia. *Proc XI JoARNdas de Producción Animal, ITEA, Vol II*, pp. 398–400.
- Lebas F, Theau-Clément M, Remy B, Drion P, Beckers JF, 1996: Production of anti-PMSG antibodies and its relation to the productivity of rabbit does. *World Rabbit Sci* **42**, 57–65.
- Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X, 2004: Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* **70**, 1776–1781.
- Marsafy YM, Hafez ES, 1981: Egg transport and postcoital isthmic contractility in the rabbit. *J Reprod Med* **26**, 558–562.
- Medjdoub N, Forcada F, López M, 2000: Embryo Production From Repeated Induction of Ovulation in Gigante de España Does. *Proc 7th World Rabbit Congress, Valencia*, pp. 191–195.
- Mehaisen GM, Vicente JS, Lavara R, 2004: In vivo embryo recovery rate by laparoscopic technique from rabbit does selected for growth rate. *Reprod Domest Anim* **39**, 347–351.

- Mehaisen GM, Vicente JS, Lavara R, Viudes-de-Castro MP, 2005: Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development postvitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci* **90**, 175–184.
- Mehaisen GM, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, Lavara R, 2006: In vitro and in vivo viability of vitrified and non- vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology* **65**, 1279–1291.
- Misra AK, Kasiraj R, Rao MM, Rangareddy NS, Jaiswal RS, Pant HC, 1998: Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* **50**, 637–649.
- Ortiz ME, Bedregal P, Carvajal MI, Croxatto HB, 1986: Fertilized and unfertilized ova are transported at different rates by the hamster oviduct. *Biol Reprod* **34**, 777–781.
- Osada H, Fujii TK, Tsunoda I, Takagi K, Satoh K, Kanayama K, Endo T, 1999: Fimbrial capture of the ovum and tubal transport of the ovum in the rabbit, with emphasis on the effects of beta 2-adrenoreceptor stimulant and prostaglandin F2 alpha on the intraluminal pressures of the tubal ampullae. *J Assist Reprod Genet* **16**, 373–379.
- Salomy M, Harper MJ, 1971: Cyclical changes of oviduct motility in rabbits. *Biol Reprod* **4**, 185–194.
- Salveti P, Theau-Clément M, Beckers JF, Hurtaud J, Guerin P, Neto V, Falières J, Joly T, 2007: Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology* **67**, 1185–1193.
- Spilman CH, Shaikh AA, Harper MJ, 1978: Oviductal motility amplitude and ovarian steroid secretion during egg transport in the rabbit. *Biol Reprod* **18**, 409–417.
- Suzuki H, Tsutsumi Y, 1981: Intraluminal pressure changes in the oviduct, uterus, and cervix of the mated rabbit. *Biol Reprod* **24**, 723–733.
- Swanson WF, Roth TL, Graham K, Horohov DW, Godke RA, 1996: Kinetics of the humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. *Am J Vet Res* **57**, 302–307.
- Tsutsumi Y, Hafez ES, 1974: Distribution patterns of rabbit embryos during preimplantation stage. *J*

Morphol **144**, 323– 336.

Vicente JS, Viudes-De-Castro MP, García M de L, Baselga M, 2003: Effect of rabbit line on a program of cryopreserved embryos by vitrification. *Reprod Nutr Dev* **43**, 137–143.

Vicente JS, Viudes de Castro MP, Lavara R, Mocé E, 2004: Study of fertilising capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in rabbit using ADN markers. *Theriogenology* **61**, 1357–1365.

Vincent C, Garnier V, Heyman Y, Renard JP, 1989: Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fertil* **87**, 809–820.

Whyman D, Moore RW, 1980: Effects of PMSG and the prostaglandin F-2 alpha analogue, cloprostenol, on superovulation, fertilization and egg transport in the ewe. *J Reprod Fertil* **60**, 267–272.

Yang X, Jiang S, Kovacs A, Foote RH, 1992: Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. *Biol Reprod* **47**, 636–643.

Esperimento 3.4

3.4. Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo

3.4.1. Abstract

Vitrification of embryos is being increasingly important for cryopreservation in mammals. However, damage and toxicity has to be reduced even more. The composition of cryoprotective medium used to immerse the embryos affects viability and developmental potential. The aim of this work was to assess the effect of the Polyvinylalcohol-PVA- and Dextran addition to vitrification media on the *in vitro* development of rabbit embryos from superovulated and non-superovulated females. Superovulation group were treated intramuscularly with 25 IU rhFSH. The vitrification media contained the same permeable cryoprotectants (Ethylene Glycol-ET- and Dimethyl Sulfoxide-DMSO-) and different macromolecules (PVA and Dextran) in different combinations. There was a significantly higher proportion of embryos without damages in mucin coat or *zona pellucida* after warming (undamaged embryos) in the control than in the superovulation group (95.8% vs. 83.2%, respectively). The proportion of undamaged embryos was significantly affected by the vitrification solution composition. The rate of undamaged embryos after warming in media containing 20% DMSO was significantly lower in media supplemented with PVA than in media with dextran (67.3 vs. 93.8, respectively). However, the proportion of undamaged embryos for the medium supplemented with dextran was similar for media with 15 or 20% DMSO. In conclusion, the addition of dextran to the vitrification media improve the preservation of rabbit embryos and permits to reduce the amount of DMSO for vitrification. Additionally, *in vitro* developmental ability of undamaged embryos were not affected by superovulation treatment nor vitrification media.

*This study has been published in *Theriogenology* 2010; 74: 1623-1628

3.4.2. Introduction

Recent advancement in cryopreservation of mammalian oocytes and embryos has exclusively been achieved with vitrification. The survival rate after vitrification differs depending on the method of cryopreservation, type and concentration of cryoprotectants, cooling rates, as well as the embryo quality. Substantial advances were made to decrease the toxicity of cryoprotectants by applying less toxic and more permeable chemicals, increasing cooling and thawing rates using both new carrier tools and devices producing vacuum in the liquid nitrogen (Vajta y Kuwayama, 2006). In spite of technical improvement of vitrification methods, more assays are necessary to replace traditional slow-rate freezing methods of commercial embryology.

Real benefit of vitrification arises in cells that do not survive classical slow freezing, either because they are negatively affected by chilling injury or because intracellular ice formation occurs at too high temperature (Mazur *et al.*, 2008). Vitrification is also simpler and quicker than slow equilibrium freezing; however, the conditions for achieving it can be very demanding. The high concentrations of cryoprotectants required for the vitrification process are near the maximums tolerated by cells, and small differences in cooling and warming rates can spell the difference between success and failure (Mazur *et al.*, 2008).

Regarding medium composition, it is known that permeable cryoprotectants present different degree of embryotoxicity, in fact, those strong glass-formers such as DMSO are considered more toxic than weak-glass formers such as Ethylene Glycol (Fahy *et al.*, 2004). However, in order to reduce the amount of permeable cryoprotectant used, large molecular weight polymers can be added to vitrification media (Martino *et al.*, 1996; Kuleshova *et al.*, 2001). Several of these molecules have been studied, such as Polyvinylalcohol (PVA), (Vajta *et al.*, 1999; Carroll *et al.*, 1993; Naitana *et al.*, 1997; Nowshari and Brem, 2000; Wowk *et al.*, 2000; Checure and Seidel, 2007), Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Gutiérrez *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1997; Mtango *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008), Ficoll (Kasai *et al.*, 1992; Papis *et al.*, 2005; Kuleshova *et al.*, 2001) or Dextran (Shaw *et al.*, 1997; Kuleshova *et al.*, 2001). Polymers can enhance the properties of vitrification medium preventing osmotic injury,

coating the cells, protecting the cell membrane, serving as bulking agents or increasing the tendency of the solution to supercool (Kuleshova *et al.*, 2001). PVA is considered an “ice blocker”, inhibiting the ice crystals formation by binds to ice nucleators (Wowk *et al.*, 2000), while dextran acts mainly modifying the viscosity of the solution to temperature and reducing its tendency to crack (Shaw *et al.*, 1997).

On the other hand, when a reproductive cryopreservation program is planned, usually is necessary to obtain the highest number of oocytes or embryos as possible, thus, superovulation treatments are performed. However, superovulation may induce alteration in embryos, doing them more sensitive to cryoconservation process than non superovulated embryos (Kauffmann *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006).

The aim of this work was to assess the effect of PVA and dextran addition to an ethylene glycodimethyl sulfoxide vitrification solution on the *in vitro* development of rabbit embryos from superovulated and nonsuperovulated females.

3.4.3. Material and methods

All the chemicals were reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich Química S.A. (Alcobendas, Madrid, Spain). The research was carried out at the experimental farm of the Animal Technology Centre (Segorbe, Castellón). The experiments were approved by the Ethics Committee of the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

Superovulation treatment and artificial insemination

Nulliparous New Zealand White does were used. Rabbits were randomly distributed in two groups: (i) superovulation group; does were treated intramuscularly with a total dose of 25 IU rhFSH (Gonal-F® 75, Serono, Italy) dissolved in PVP 30% solution (MW 40 000) in distilled water and distributed in three equal doses at 24 h intervals; and (ii) control group; females were not superovulated but were treated intramuscularly with the vehicle (PVP 30% solution) at the same time as the other group. Artificial insemination was performed 24 hours after the last injection.

Ovulation was induced with 2 μ g buserelin acetate (Suprefact, Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, Spain) given intramuscularly at the time of insemination.

Embryo recovery

Seventy two hours after artificial insemination, embryos were recovered post-mortem. Reproductive tracts of sacrificed females were removed immediately and flushed separately with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS). Collected liquid was poured into sterile Petri dishes and examined under stereo microscope. Embryos were scored by morphological criteria according to International Embryo Transfer Society classification. Only embryos in morulae stage with homogeneous blastomeres and both regular mucin coat and *zona pellucida* were vitrified.

Media composition

The solution used as carrier for the cryoprotectants was DPBS supplemented with 2 g/l Bovine Serum Albumine (BSA). The vitrification media contained the same permeable cryoprotectants (EG and DMSO) and different macromolecules (Polyvinylalcohol 30000–70000 MW and dextran 60000 – 90000 MW). The composition of vitrification media is presented in Table 3.4.1.

Table 3.4.1. Vitrification solutions composition.

Composition (%v/V)	Media				
	A	B	C	D	E
EG	20	20	20	20	20
DMSO	20	20	20	15	15
PVA	-	1	-	-	1
Dextran	-	-	10	10	10

EG: ethylene glycol; DMSO: dimethylsulfoxide; PVA: polyvinylalcohol

The A medium has been used by our group since 1994 with some modifications (Vicente and García-Ximenez, 1994; Vicente *et al.*, 1999). The ability of the A medium to vitrify after

supplementation with different concentration of dextran was established in a preliminary experiment. Media with 10% dextran supplementation remained free of ice during cooling and allowed the reduction of DMSO concentration (data not shown). The PVA concentration used was 1%, according to results of Checura and Seidel (2007).

Vitrification procedure

A total of 806 embryos were vitrified; 360 embryos from control and 446 embryos from superovulated donors. Embryos were randomly distributed, within each treatment group (superovulation or control), in five subgroups depending on the vitrification media (A, B, C, D, and E). Embryos were vitrified in two step addition procedure. Briefly, the embryos were washed three times in DPBS supplemented with 2 g/l BSA. Groups of 8–10 embryos were exposed to the vitrification media diluted to 50% in DPBS supplemented with 4 g/l BSA for 2 min, and then moved into a well containing the vitrification media for 1 min. Immediately, the embryos suspended in the cryopreservation media were loaded into 0.25 ml sterile plastic straws (IMV, L'Aigle, France) between two drops of DPBS separated by air bubbles, sealed with a sterile plug and plunged directly into liquid nitrogen.

Warming procedure

Straws were removed from liquid nitrogen and submerged into a water bath at 20 °C for 10 s. Immediately, the cryopreservation medium was removed while loading the embryos into a solution containing DPBS supplemented with 2 g/l BSA and 0.33M sucrose for 2 min, followed by one bath in DPBS with 2 g/l BSA for 2 min. Embryos were evaluated under stereo microscope and only intact embryos (embryos without damages in mucine coat or zona pellucida) were cultured.

In vitro culture

A total of 670 embryos were cultured (358 superovulated and 312 control embryos). Five replicates for embryo viability evaluation were performed. Embryos were cultured for 48 h in medium TCM-199 + 20% Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich Quimica S.A., Madrid, Spain) at 38.5 °C, 5% CO₂ and saturated humidity. Embryo viability and the developmental stages of embryos were

assessed and recorded for later subsequent analysis.

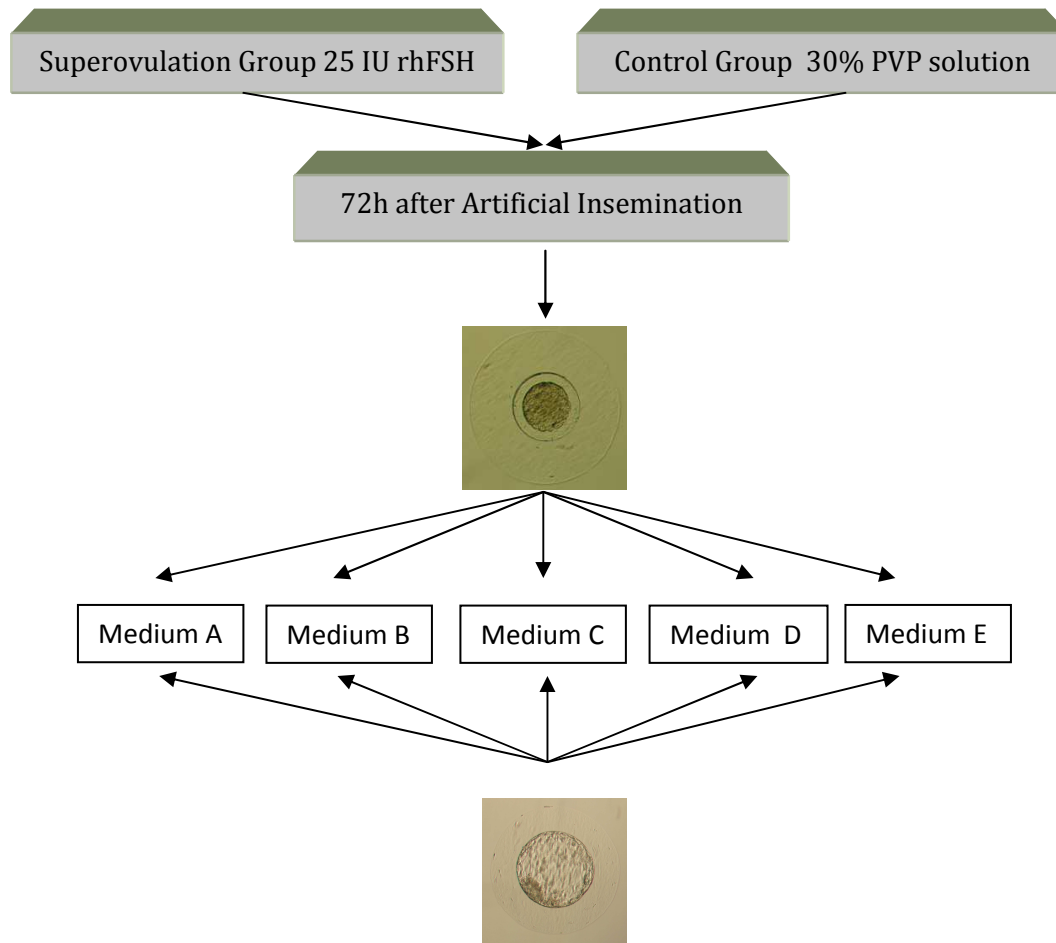


Figure 10. Experimental design resume

Statistical analyses

The variables analysed were undamaged embryos rate (UER = intact embryos/ total vitrified embryos), development rate (DR = expanded blastocysts/cultured embryos), hatching rate (HR = hatching blastocysts/cultured embryos), total efficiency rate (TER = expanded blastocysts/total vitrified embryos). Differences between treatment and vitrification media were compared with General Linear Mixed Model (GLIMMIX) procedure of the Statistical Analysis System (SAS Inc. Cary, NC, USA). Treatment (superovulation or control group) and vitrification media (A, B, C, D, and E) were considered fixed effects in the model, while vitrification session and culture session were

regarded as random effects. A binomial distribution with a logit-link function was used. Means were separated using Fisher's protected least significant difference, with treatment effect declared significant at $P < 0.05$. For ease of interpretation, means and standard errors shown in the tables are presented on the scale of the data (logit scale).

3.4.4. Results

There was a significantly higher proportion of undamaged embryos (UER) after warming in the control than in the superovulation group (95.8% vs. 83.2%, respectively; $P < 0.05$, Table 3.4.2). Only mucin coat and/or zona pellucida were damaged after thawing. In addition, as shown in Table 3.4.2, the proportion of undamaged embryos was significantly affected by the vitrification solution composition ($P < 0.001$). The UER was significantly lower for media without dextran (76.4% and 67.3%, for A and B media, vs. 93.8%, 94.7%, and 98.7% for C, D, and E media, respectively).

The rate of undamaged embryos after warming in media containing 20% DMSO was significantly lower in media supplemented with PVA than in media with dextran (67.3 for B vs. 93.8 for C, respectively). The rate of undamaged embryos was not different between medium containing 20% or 15% DMSO supplemented with dextran (C and D, respectively). However, the proportion of undamaged embryos for the medium containing 15% DMSO supplemented with dextran and PVA was significantly higher than those containing 20% DMSO supplemented with dextran and without PVA (98.7% vs. 93.8% for E and C, respectively).

Table 3.4.2. Effect of treatment and vitrification medium on embryo integrity (mean \pm standard error).

	N	UER (%)
	Treatment	
Control	360	95.8 \pm 2.3 ^a
Superovulation	446	83.2 \pm 8.9 ^b
	Medium	
A	157	76.4 \pm 9.2 ^a
B	146	67.3 \pm 10.1 ^a
C	170	93.8 \pm 3.3 ^b
D	171	94.7 \pm 2.9 ^{b,c}
E	162	98.7 \pm 1.0 ^c

N: Number of Vitrified Embryos; UER: Intact Embryos after warming/Vitrified embryos.

Values with different superscripts in the same column, are statistically different (P < 0.05).

As shown in Table 3.4.3, the embryo production treatment (superovulation or control) did not significantly affect *in vitro* development rates (75.8% and 78.7% *in vitro* development rate until the expanded blastocyst stage and 58.6% and 62.6% *in vitro* development rate until the hatched blastocyst stage for control and superovulated group respectively). No significant differences among development rate of embryo cultured after vitrification and warming in different media were detected. The only significant difference was found in the total efficacy rate. There was higher efficacy rate in media supplemented with dextran (50.9% and 47.4% for A and B vs. 74.12%, 66.4% and 76.9% for C, D, and E, respectively). The efficacy rate of media containing 15% DMSO and dextran was significantly improved with the presence of PVA (66.4% vs. 76.9% for D and E media, respectively).

Table 3.4.3. Effect of treatment and vitrification medium on development potential of embryos (mean \pm standard error).

	N	DR (%)	HR (%)	TER (%)
	Treatment			
Control	312	75.8 \pm 5.7	58.6 \pm 7.1	65.8 \pm 5.6
Superovulation	357	78.7 \pm 5.8	62.6 \pm 7.4	62.0 \pm 6.5
	Medium			
A	107	79.8 \pm 5.9	64.5 \pm 7.6	50.9 \pm 6.7 ^a
B	96	72.2 \pm 7.1	55.7 \pm 8.2	47.4 \pm 6.7 ^a
C	157	80.5 \pm 5.4	63.6 \pm 7.2	74.1 \pm 5.4 ^{b,c}
D	150	74.8 \pm 6.4	58.0 \pm 7.6	66.4 \pm 6.0 ^b
E	160	78.4 \pm 5.7	61.0 \pm 7.4	76.9 \pm 5.1 ^c

N: cultured embryos; DR: Development Rate = expanded embryos/ cultured Embryos; HR: Hatching rate = hatched embryos/cultured embryos; TER: Total Efficiency Rate = expanded embryos/vitrified embryos.

Values with different superscripts in the same column are statistically different (P < 0.05).

3.4.5. Discussion

When cryopreserved mammalian embryos are re- covered from liquid nitrogen, embryos with morphological damages are found. Usually, damaged blastomeres, cracked *zona pellucida* or mucin coat are related to suboptimal cryopreservation procedures. In several species as human or rabbits, cracked *zona pellucida* or mucin coat respectively is enough to reduce drastically *in vivo* development of cryopreserved embryos (Kasai *et al.*, 1996). In rabbits is well known the essential role of mucin coat in the embryo development and implantation (Greenwald, 1962; Moore *et al.*, 1968; Rottman and Laampeter, 1981; Kojima *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1990; Kasai *et al.*, 1993; Joung *et al.*, 2004), therefore, the cryopreservation media and procedures must avoid damages on rabbit embryo coats. Different cryoprotectants and vitrification containers have been tested with success in rabbits using high concentration of permeable cryoprotectants (40– 50% dimethylsulfoxide-ethylene glycol) or in combination with non-permeable cryoprotectants (sucrose

or ficoll). In this study, the addition of dextran polymer to vitrification media showed a lower incidence in mucin coat damage and/or zona pellucida crack, so 94–99% of vitrified embryos resulted undamaged in media containing 35 or 40% of permeable cryoprotectants (dimethylsulfoxide and ethyleneglycol) and dextran, alone or with PVA, reaching a develop rate at expanded blastocyst of 76–79%. Results are in accordance of those obtained by Dumoulin *et al.* (1994) in human and mouse. Probably, dextran protect embryos against cryoinjury by mitigating the mechanical stress occurring during cryopreservation and by building a viscous matrix around these embryos, which prevents crystallization in the transition phase between solid and liquid during warming process (-135 °C and -110 °C, (Rall, 1987). Therefore, when PVA was added alone, no favorable effects on intact embryos were detected. These results were in agreement with previous studies with PVA freezing medium in mouse oocytes (Carroll *et al.*, 1993; Nowshari and Brem, 2000) and PVA vitrification medium in ovine embryos (Naitana *et al.*, 1997).

On the other hand, the high doses and repeated administration of eCG and FSH used in the superovulation treatments may cause various problems, such as the ovulation of a high number of abnormal haemorrhagic and cystic follicles and abnormal developed embryos (Mehaisen *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006), as well as the cytogenesis defects and chromosomal alterations of recovered embryos (Carney and Foote, 1990; Kauffmann *et al.*, 1998). In the other hand, it has been showed that superovulation treatment with recombinant FSH did not affect the capacity of superovulated embryos to recover their structural and functional integrity after thawing when a slow-freezing protocol was used (Viudes de Castro *et al.*, 2009). In the present study, superovulated embryos seem more sensitive to vitrification procedure, increasing the percentage of damaged embryos, in accordance with the results obtained by Mehaisen *et al.*, (2006) in does superovulated with oFSH and eCG. Therefore, the *in vitro* developmental ability of vitrified embryos recovered from superovulated does with eCG or oFSH was lower than control does. Furthermore, in the present work, the *in vitro* developmental ability of vitrified embryos recovered from superovulated does with eCG or oFSH was lower than control does. Furthermore, in the present work, the *in vitro* developmental ability of vitrified embryos were not affected by the superovulation treatment used.

In conclusion, findings from the present study indicated that the addition of dextran to 20% EG and 20% DMSO vitrification medium improve the preservation of the essential coats of three day rabbit embryos and permits to reduce the amount of DMSO required to achieve vitrification. Additionally, *in vitro* developmental ability of undamaged embryos were not affected by superovulation treatment nor vitrification media in the current experiment. However, further studies of the *in vivo* viability of cryopreserved-superovulated rabbit embryos with dextran addition to the vitrification media must be done.

3.4.6. References

- Carney EW, Foote RH. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos *in vivo* and *in vitro*. J Reprod Fertil 1990;89: 543–551.
- Carroll J, Wood MJ, Whittingham DG. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. Biol Reprod 1993;48: 606–612.
- Checura CM, Seidel Jr GE. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. Theriogenology 2007;67: 919–930.
- Dumoulin C, Bergers-Janssen JM, Pieters MH, Engelsu ME, Geraedts JP, Evers JL. The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. Fertil Steril 1994;62: 793–798.
- Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. Cryobiology 2004;48: 22–35.
- Greenwald GS. The role of mucin layer in development of the rabbit blastocyst. Anatomical Record 1962;142: 407–415.
- Gutierrez A, Garde J, Artiga CG, Muñoz I, Pintado B. *In vitro* survival of murine morulae after quick freezing in the presence of chemically defined macromolecules and different cryoprotectants. Theriogenology 1993;39: 1111–1120.
- Joung SY, Kim HJ, Choi WS, Im KS, Lee SH, Park Ch, Jin DI. Effects of transferring *in vitro*-cultured rabbit embryos to recipient oviducts on mucin coat deposition, implantation and development. Zygote 2004;12: 215–219.
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T, Machida T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Biol Reprod 1992;46: 1042–1046.
- Kasai M, Hiraishi M, Nureki I, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Influence of the mucin coat on the survival of rabbit and mouse embryos stored at 0 °C. J Experiment Zool 1993;267:344–349.
- Kasai M, Zhu S, Pedro P, Nakamura K, Sakurai T, Edashige K. Fracture damage of embryos and its

- prevention during vitrification and warming. *Cryobiology* 1996;33: 459–464.
- Kauffman RD, Schmidt PM, Rall WF, Hoeg JM. Superovulation of rabbits with FSH alters *in vivo* development of vitrified morulae. *Theriogenology* 1998;50: 1081–1092.
- Kim CG, Yong H, Lee G, Cho J. Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5% of PVP is beneficial for *in vitro* and *in vivo* development of frozen-thawed mouse embryos. *J Reprod Dev* 2008;54: 250–253.
- Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa H, Kato Y, Ogawa S. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. *Theriogenology* 1990;33: 777–788.
- Kojima T, Hashimoto K, Ito S, Hori H, Tomizuka T, Oguri N. Protection of rabbit embryos against fracture damage from freezing and thawing by encapsulation in calcium alginate gel. *JouARNI of Experimental Zoology* 1990;254: 186–191.
- Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 2001;43: 21–31.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996;54: 1059–1069.
- Mazur P, Leibo SP, Seidel CP. Jr Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biology of Reproduction* 2008;78: 2–12.
- Mehaisen GM, Vicente JS, Lavara R, Viudes-de-Castro MP. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and *in vitro* development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci* 2005;90: 175–184.
- Mehaisen GM, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, Lavara R. *In vitro* and *in vivo* viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology* 2006;65: 1279–1291.
- Moore NW, Adams CE, Rowson LEA. Developmental potential of single blastomeres of rabbit eggs. *JReprod Fert* 1968;17: 527–531.
- Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Otoi T, Suzuki T. The effect of prefreezing the diluent portion of

- the straw in a stepwise vitrification process using ethylene glycol and polyvinylpyrrolidone to preserve bovine blastocysts. *Cryobiology* 2001;42: 135–138.
- Naitana S, Ledda S, Loi P, Leoni G, Bogliolo L, Dattena M, Cappai P. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim Reprod Sci* 1997;48: 247–256.
- Nowshari MA, Brem G. The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. *Theriogenology* 2000;53: 1157–1166.
- Papis K, Sypecka J, Korwin-Kossakowski M, Wenta-Muchalska E, Bilska B. Banking of embryos of mutated, paralytic tremor rabbit by means of vitrification. *Laboratory Animals* 2005;39: 284–289.
- Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987;24:387–402.
- Rottman OJ, Lampeter WW. Development of early mouse and rabbit embryos without zona pellucida. *J Reprod Fert* 1981;61:303–306.
- Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextrane. *Cryobiology* 1997;35: 219–229.
- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006;65: 236–244.
- Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 1999;52:939–948.
- Vicente JS, García-Ximénez F. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenology* 1994;42(7):1205–1215.
- Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, García ML. *In vivo* survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein. *Reprod Nutr Dev* 1999;39:657–662.
- Viudes de Castro MP, Cortell C, Mocé E, Marco-Jiménez F, Joly T, Vicente JS. Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology* 2009;72: 655–662.

Wowk B, Leitl E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, Fahy GM. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000;40:228–236.

DISCUSIÓN GENERAL

La conservación de un banco de recursos genéticos animales que tengan un valor elevado debido a su genética o a su singularidad (animales con interés biomédico o en peligro de extinción), requiere de una serie de pasos como la producción de embriones o gametos, la obtención del mayor número posible de los mismos, la aplicación de una adecuada técnica de recuperación en función de cada caso y, por último, su conservación, asegurando su máxima viabilidad.

El establecimiento de un tratamiento de estimulación ovárica que multiplique el desarrollo folicular propio de una especie sin afectar a la calidad ovocitaria es una etapa crítica para la implementación efectiva de distintas tecnologías reproductivas. Si bien la producción de ovocitos y embriones de coneja es relativamente sencilla dado el carácter prolífico de esta especie y su corto ciclo, la maximización del número de embriones de calidad recuperados por cada hembra es un objetivo más que deseable que puede conseguirse, bien a través de la aplicación de tratamientos de superovulación, bien a través de la recuperación repetida de embriones, o bien mediante la combinación de ambas posibilidades.

Habitualmente, para inducir la superovulación en conejas se utilizan preparados de FSH de origen animal (Kennelly and Foote, 1965; Kauffman *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007b; Salvetti *et al.*, 2010). Sin embargo, los resultados obtenidos tras su utilización presentan un alto grado de variabilidad. Éste podría deberse, entre otros factores, al grado de contaminación o impureza de LH que presentan algunos de estos preparados (Donaldson and Ward, 1986; Murphy *et al.*, 1984; Lindsell *et al.*, 1986). Una de las posibles alternativas para reducir esta variabilidad sería la utilización de FSH de origen recombinante, ya que no presenta contaminación por LH u otras moléculas proteicas y presenta una mayor consistencia entre lotes y un riesgo nulo de transmisión de enfermedades (Howles, 1996).

Por ello, el primer trabajo de esta tesis pretendió evaluar el efecto de las gonadotropinas recombinantes humanas (rhFSH y rhLH) sobre la estimulación ovárica de la coneja, determinando el impacto de la LH sobre el desarrollo embrionario *in vitro* tanto de embriones frescos como congelados. Por otra parte, dada la importancia de optimizar la producción embrionaria de una

hembra, se planteó estudiar cómo afectaba tanto a la respuesta ovulatoria como a la inmune de las hembras recibir hasta cuatro tratamientos sucesivos de superovulación con gonadotropinas recombinantes.

Los resultados de este primer trabajo indicaban que la rhFSH, sola o en combinación con rhLH, inducía respuesta superovulatoria en las hembras, duplicando la tasa de ovulación respecto a las hembras control. Resultados similares a los obtenidos por otros autores mediante el uso de FSH de origen animal (Kauffman *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1999; Mehaisen *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007b).

Sin embargo, si bien no detectamos diferencias en cuanto a la tasa de ovulación entre tratamientos, sí las observamos en la calidad de los embriones recuperados, ya que mientras los embriones recuperados de hembras superovuladas con rhFSH sola o con un 5% de rhLH presentaban una tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto expandido similar al grupo control, los obtenidos con el tratamiento de rhFSH más 10% de rhLH mostraron una tasa de desarrollo significativamente menor que el grupo control.

Para explicar la influencia que ejerce la LH sobre los resultados de un tratamiento de superovulación, hay que contemplar diferentes aspectos. En primer lugar, la aplicación de cualquier tratamiento de superovulación resulta en una alteración de los niveles de FSH y LH circulantes (Laborde *et al.*, 1981), lo cual es de gran importancia en el proceso de maduración ovocitaria (Hillier, 2009). Parece ser que, la FSH es la principal responsable de la tasa de ovulación, mientras que la LH es la que influye principalmente en la calidad de los ovocitos o embriones obtenidos (Donaldson and Ward, 1986), así, un exceso de la misma puede ejercer un efecto negativo en la calidad ovocitaria mediante la estimulación prematura del ovocito (Moor *et al.*, 1984) o bien por la interferencia en la comunicación entre las células de la granulosa y el *cumulus* oophorus, punto crítico para el mantenimiento de la última fase de la meiosis hasta la ovulación (Filicori, 1999).

Sin embargo, los resultados obtenidos en distintos trabajos son un tanto contradictorios, si bien, estas discrepancias podrían deberse a la cantidad de LH administrada en cada caso. Así, mientras que la suplementación con LH parece no tener efecto en los tratamientos realizados en humana (Balasch *et al.*, 2001; Penarrubia *et al.*, 2003), yeguas (Rosas *et al.*, 1998) o conejo (Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007b); se ha descrito un empeoramiento de la calidad de los embriones recuperados en vacuno tras un aumento tanto de la cantidad de LH administrada como del ratio LH/FSH (Donaldson and Ward, 1986). De hecho, en ovino, se ha observado que la adición de eCG al tratamiento de FSH puede provocar también una disminución en la calidad de los embriones recuperados, seguramente debido, en parte, a la actividad LH de la eCG (Leoni *et al.*, 2001)

Por lo que puede decirse que, si bien es necesario un valor umbral mínimo de actividad LH asociado con una respuesta ovárica adecuada, éste es muy bajo. Además, se ha visto que la FSH tiene efecto en las células de la granulosa activando los mecanismos paracrinos que regulan la respuesta de las células de la teca a la LH (Hillier, 2000), por lo que dosis altas de FSH usadas en un período crítico, durante la fase folicular temprana pueden resultar en concentraciones de LH residuales muy bajas (Peñarrubia *et al.*, 2003) De hecho, en humanos se estima que, para que se dé una correcta esteroidogénesis, menos del 1% de los receptores de LH han de estar ocupados (Chappel and Howles, 1991; Levy *et al.*, 2000). Por ello, parece coherente asumir que no es necesaria la administración exógena de LH para que se lleve a cabo una correcta ovulación, pudiendo ser, de hecho, contraproducente por el efecto negativo de un exceso de la misma sobre la calidad de los ovocitos o embriones recuperados. En nuestro trabajo, los resultados del grupo con un 10% de rhLH sugieren que ha habido un exceso de LH en las hembras, lo que explicaría la menor tasa de desarrollo obtenida en este caso.

Dada la mayor sensibilidad que pueden presentar los embriones procedentes de hembras sometidas a altas dosis de gonadotropinas a los tratamientos de crioconservación (Mehaisen *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006), se evaluó en este mismo trabajo el desarrollo *in vitro* de los embriones tras someterlos a un proceso de congelación lenta, observándose unas tasas de desarrollo similares

en todos los grupos, en torno al 83,5% de media, resultados similares a los obtenidos por diferentes autores con diferentes técnicas de crioconservación (López-Béjar and López-Gatius, 2002; Naik *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007b).

Por otra parte, cuando el valor genético de las conejas es elevado, la posibilidad de practicar recuperaciones repetidas de una misma hembra es una buena alternativa para maximizar el número de embriones obtenidos de ella. Sin embargo, se ha observado que la estimulación repetida mediante gonadotropinas, ya sea eCG o FSH, puede repercutir negativamente en la respuesta superovulatoria obtenida, tanto en conejos (Renard *et al.*, 1982; Mehaisen *et al.*, 2006), como en otras especies (Lubbadeh *et al.*, 1980; Torres and Sevellec, 1987; Loseke and Spanel-Borowski, 1996; Swanson *et al.*, 1996; Combelles and Albertini, 2003). En este contexto, en el segundo experimento de este trabajo se repitió el tratamiento de superovulación con rhFSH en cuatro ocasiones sobre las mismas hembras, lo que provocó una disminución de su respuesta superovulatoria, sin embargo, a pesar de ello, la tasa de ovulación obtenida fue en todas las ocasiones significativamente superior a la observada en el grupo control, resultados que coinciden con los obtenidos en diferentes trabajos tanto en conejos como en otras especies (Lubbadeh *et al.*, 1980; Renard *et al.*, 1982; Torres and Sevellec, 1987; Loseke and Spanel-Borowski, 1996; Swanson *et al.*, 1996; Meldrum *et al.*, 1998; Combelles and Albertini, 2003; Mehaisen *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008). No obstante, en otros casos esta disminución en la tasa de ovulación no ha sido detectada (Caligara *et al.*, 2001) o, si bien se ha detectado una tendencia a la disminución de la respuesta, no se han conseguido resultados significativos (Roy *et al.*, 1999; Kanayama and Osada, 2000; Magarey *et al.*, 2003).

Entre las posibles causas ofrecidas para explicar esta variación en la respuesta ovulatoria, se han apuntado la reducción del lecho microvascular de los folículos maduros (Loseke and Spanel-Borowski, 1996) o la falta del tiempo necesario para que los posibles folículos receptivos a la estimulación se desarrollen (Magarey *et al.*, 2003). Respecto a este último punto, parece que el aumento del intervalo entre tratamientos permite una recuperación de los folículos y el ovario, induciendo una mejora en la respuesta (Lubbadeh *et al.*, 1980; Kanayama and Osada, 2000; Magarey

et al., 2003; Yang *et al.*, 2008). Sin embargo, en nuestro caso, no se observó un incremento en la respuesta tras alargar el tiempo de descanso entre el tercer y cuarto tratamiento. Por otra parte, otros autores han observado una recuperación de la respuesta superovulatoria tras cambiar la hormona elegida para inducir la superovulación (Maurer *et al.*, 1968; Mehaisen *et al.*, 2006), lo que indicaría que los ovarios mantienen la capacidad de responder a la estimulación superovulatoria.

Una de las posibles causas de la disminución de respuesta podría deberse a la menor cantidad de hormona que alcanza el ovario, lo que podría explicarse por la aparición de una respuesta inmunitaria por parte de la hembra, ya que, tanto en conejos (Bourdillon *et al.*, 1992; Boiti *et al.*, 1995; Lebas *et al.*, 1996), como en otras especies (Swanson *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1999; Magarey *et al.*, 2003), se ha comprobado la aparición de anticuerpos tras la aplicación de un tratamiento hormonal en repetidas ocasiones. En nuestro caso detectamos anticuerpos contra la rhFSH tras la segunda aplicación del tratamiento de superovulación, resultados que coinciden con los obtenidos por los autores previamente citados.

En cuanto a la relación entre la respuesta inmunitaria y el efecto en la reproducción, los datos son variados. En humana, el aumento del nivel de anticuerpos periféricos se ha asociado con distintos grados de infertilidad (Haller *et al.*, 2005; Shatavi *et al.*, 2006; Haller *et al.*, 2007), ya que parece ser que el nivel de ciertos anticuerpos anti-FSH pueden estar relacionados con el nivel de FSH circulante y pueden provocar una reducción de la funcionalidad de ésta (Haller *et al.*, 2008). En cambio, en ratón si bien sí se ha detectado un aumento de los anticuerpos anti-FSH circulantes, éste no se ha traducido en una disminución de la respuesta (Magarey *et al.*, 2003). En nuestro caso, mientras la TO disminuyó desde el segundo tratamiento, el nivel de anticuerpos circulantes no aumentó hasta el tercero. Este hecho podría explicarse por un retraso en la aparición de la respuesta inmunitaria tras la inyección de la gonadotropina, como se ha observado en ovejas (Roy *et al.*, 1999) o wallaby (Magarey *et al.*, 2003), que, tal y como observaron Roy *et al.*, (1999), fuera menor a partir del segundo tratamiento. De este modo, podría haber ocurrido que, si bien tras el segundo tratamiento pudo aparecer respuesta inmunitaria, ésta se manifestó con posterioridad a la

extracción de sangre (seis días tras la aplicación de la rhFSH). Por otro lado, si la respuesta inmunitaria es responsable en gran medida de la disminución de la respuesta superovulatoria, cabe pensar que ésta tendrá un alto componente individual; de hecho, en el presente estudio se observó que el descenso de la tasa de ovulación tras los tratamientos repetidos se debía en mayor medida a la disminución del número de hembras que respondían que a la tasa de ovulación de cada una de ellas; lo cual se corresponde con los datos obtenidos por otros autores, tanto en conejos (Bourdillon *et al.*, 1992; Lebas *et al.*, 1996) como en distintas especies (Swanson *et al.*, 1996; Van Blerkom and Davis, 2001; Kanayama and Osada, 2000; Roy *et al.*, 1999; Combelles and Albertini, 2003).

Además, tanto la hormona administrada, como el origen de la misma, podrían afectar la repuesta inmunitaria. Así, se ha observado que la mayor permanencia en sangre de la eCG respecto a la FSH, puede causar un aumento en la intensidad de la respuesta (Maertens and Luzi, 1995; Rose *et al.*, 2000); de hecho, Lubbadah *et al.* (1980) detectaron una disminución significativa en la respuesta superovulatoria tras la estimulación repetida con eCG, mientras que, tras aplicar la FSH en repetidas ocasiones, el descenso en la respuesta no resultó significativo. Por otra parte, en conejos, tras la administración de eCG incluso en bajas dosis, ya se ha observado una respuesta inmunitaria (Boiti *et al.*, 1995; Lebas *et al.*, 1996). Del mismo modo, el origen de la hormona podría también influir en la respuesta inmunitaria. Así, (Mehaisen *et al.*, 2006) observaron una falta de respuesta superovulatoria en conejas tras la administración repetida de FSH de origen ovino, observando en la segunda aplicación una tasa de ovulación similar al grupo control. En nuestro caso, si bien observamos una disminución significativa de la tasa de ovulación, la respuesta superovulatoria se mantuvo en los sucesivos tratamientos, pudiendo sugerir este hecho una menor respuesta inmunitaria a la FSH recombinante.

Dada la gran variabilidad de resultados existente entre los diferentes protocolos de superovulación utilizados en conejo, en el segundo trabajo de la presente tesis se planteó evaluar el efecto del origen de la FSH (porcina o recombinante) y del protocolo de administración sobre la calidad ovocitaria y la capacidad de desarrollo embrionario.

Para lo cual, sometimos a las hembras a diferentes tratamientos superovulatorios basados en la administración de FSH recombinante humana (rhFSH) o FSH purificada de origen porcino (pFSH) utilizando diferentes pautas de administración. Los resultados reflejaron un aumento significativo de la tasa de ovulación con respecto al grupo control de los tratamientos con pFSH en suero salino (pFSH5) y rhFSH en PVP, siendo la tasa de ovulación del grupo pFSH5 significativamente mayor que la obtenida en el grupo con rhFSH.

Una de las posibles causas de estas diferencias podría estar relacionada con la concentración de FSH que alcanza los receptores foliculares. Las dosis utilizadas habitualmente para la superovulación en conejos abarcan un rango desde los 0,3 mg hasta los 13,5 mg (Kennelly and Foote, 1965; Kauffman *et al.*, 1998; Besenfelder, 2002; Mehaisen *et al.*, 2006). Sin embargo, si bien en este trabajo las dosis utilizadas se redujeron notablemente, la mayor respuesta superovulatoria obtenida con la FSH de origen porcino pudo deberse a que la cantidad de pFSH utilizada fue muy superior a la de rhFSH (31.5 mg y 1.8 mg, respectivamente). En cualquier caso, la capacidad de provocar superovulación con una dosis de 1.8 µg de rhFSH confirmaría su alto potencial biológico, debido seguramente a su gran afinidad por los receptores de FSH (Revelli *et al.*, 2006), así como por la baja proporción de formas de FSH degradadas (Olijve *et al.*, 1996).

Por otra parte, la administración de pFSH en PVP no provocó respuesta superovulatoria en las hembras, lo cual podría deberse a que la cantidad de FSH que llega al ovario estaría también en función del protocolo de administración. Dada la corta vida media de la FSH (Rose *et al.*, 2000), es apropiado administrarla cada 12 horas (Kennelly and Foote, 1965; Kauffman *et al.*, 1998; Besenfelder, 2002; Mehaisen *et al.*, 2006).

De ahí que la falta de respuesta superovulatoria tras la administración de pFSH disuelta en PVP podría indicar una disminución de la cantidad de FSH que llega al ovario. Esto podría deberse a la adsorción de la FSH al coloide utilizado quedando parte de ella atrapada (Santos-Ramos and Guerrero-Aznar, 1994). Estos resultados coincidirían con los obtenidos por Kimura *et al.*, (2007) que, utilizando gel de hidróxido de aluminio como vehículo, plantearon que un exceso del mismo

podría provocar una disminución de la respuesta debido a una readsorción de la hormona en el gel y a una liberación de la misma sostenida en el tiempo. Por otra parte, diversos autores (D'Alessandro *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2007; Simonetti *et al.*, 2008) han observado una modificación del momento de la respuesta en función del tipo de tratamiento utilizado, seguramente en respuesta a un diferente patrón de liberación de la FSH.

De ahí que, aunque una de las ventajas que se le supone a la disolución de un fármaco en un coloide es que su aprovechamiento es más eficaz y, por tanto, que con un coste inferior se puede disminuir la dosis necesaria cuando se trata de un agente activo de alto precio; esto no coincide con nuestros resultados, que sugerirían la necesidad de aumentar la dosis de pFSH utilizada diluida en PVP para equiparar el efecto de la pFSH diluida en suero salino.

Por otra parte, existen numerosos trabajos en los que se ha encontrado una elevada correlación entre la concentración de ATP del ovocito y la capacidad de desarrollo del embrión resultante (Van Blerkom *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001; Cummins, 2002; Tamassia *et al.*, 2004; Van Blerkom, 2004; Zhao *et al.*, 2006), dado el papel fundamental que presenta el metabolismo oxidativo como fuente primaria de energía en la maduración del ovocito y los estadios tempranos embrionarios (Krisher, 2004; Van Blerkom, 2010).

Los resultados obtenidos en este segundo trabajo reflejaron una disminución del ATP en los ovocitos provenientes del tratamiento con pFSH en cinco inyecciones (pFSH5) frente a los ovocitos obtenidos con los tratamientos pFSH y rhFSH en tres inyecciones. Por otra parte, la tasa de desarrollo de los embriones estimulados con pFSH5 también resultó significativamente menor que la de los embriones control. Esto coincidiría con el impacto negativo de determinados regímenes hormonales en la calidad de los ovocitos y embriones obtenidos observados en diferentes trabajos (Sugano and Shinogi, 1999; Berlinguer *et al.*, 2004; D'Alessandro *et al.*, 2005) . En nuestro caso, la disminución en la calidad y la viabilidad de los ovocitos y embriones en el grupo pFSH5 podría deberse a una sobreestimulación ovárica debido a un exceso de la cantidad de FSH que llega al ovario, ya que se ha observado que aquéllos tratamientos con un exceso de dosis hormonal

repercuten en el desarrollo embrionario (Leoni *et al.*, 2001; Berlinguer *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010). De hecho, un exceso en la dosis de gonadotropinas administradas puede ocasionar una desincronización del crecimiento ovocito-folículo y afectar a la maduración citoplasmática del ovocito (Armstrong, 1983); una desensibilización a la FSH y la LH (van Cappellen *et al.*, 1997) o un reclutamiento de folículos demasiado pequeños no preparados para madurar (Leoni *et al.*, 2001), provocando un aumento de la incidencia de folículos anovulatorios (Veiga-López *et al.*, 2006), así como una disminución en su capacidad de desarrollo posterior (Rubianes *et al.*, 1997).

El desarrollo de este segundo trabajo puso de manifiesto la carencia de un método de recuperación *in vivo* de ovocitos de coneja en metafase II, por lo que se planteó como tercer trabajo de esta tesis la puesta a punto de una técnica rutinaria válida para la recuperación de ovocitos *in vivo* y evaluar si su eficacia se ve afectada por un tratamiento de superovulación. La posibilidad de recuperar los ovocitos en este estadio es muy interesante para trabajos que impliquen la obtención de embriones *in vitro*, ya que permite prescindir de la maduración *in vitro*, un paso de baja eficiencia en conejo. Además, el hecho de poder hacerlo *in vivo*, nos permite recuperar ovocitos de forma repetida en aquellas hembras de gran valor biológico o en aquellos estudios que duren más de un ciclo reproductivo.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la posibilidad de recuperar ovocitos de coneja en metafase II por laparoscopia con un 60% de eficiencia, que, si bien fue significativamente menor que la eficiencia de recuperación de embriones (alrededor del 85%), se puede afirmar que es una tasa aceptable para llevar a cabo esta técnica. Las diferencias observadas podrían deberse al distinto momento en el que se lleva a cabo la recuperación de ovocitos y embriones, ya que entre las 16-18 horas tras la inducción de la ovulación, momento en que se recuperan los ovocitos, la contractibilidad del oviducto va en aumento (Salomy and Harper, 1971; Spilman *et al.*, 1978; Marsafy and Hafez, 1981), fenómeno que va acompañado de una disminución de la luz oviductal (Eddy *et al.*, 1978; Marsafy and Hafez, 1981), y que alcanzan su punto máximo a las 36 horas post-ovulación

(Osada *et al.*, 1999). En cambio, las contracciones de la musculatura del oviducto ceden a partir de las 72 horas tras la inducción de la ovulación (Marsafy and Hafez, 1981), momento en que se recuperan los embriones. Estos factores contribuyen al aumento de presión intraoviductal tras la perfusión del líquido, aumentando así su fragilidad ante la rotura.

Por otro lado, en el momento en que se realiza la recuperación de los ovocitos éstos se localizan próximos al infundíbulo (Hodgson and Pauerstein, 1976; Bourdage and Halbert, 1988), hecho que podría dificultar la correcta perfusión del oviducto, aumentando así la probabilidad de dejar algún ovocito sin perfundir. De este modo, superando estas dificultades, sería posible alcanzar eficiencias similares a las de que se obtienen en la recuperación de embriones.

Cabe destacar que la eficiencia de recuperación tanto de los ovocitos como de los embriones no fue disminuyendo a lo largo de las diferentes sesiones. Esto indicaría que las hembras no presentaban lesiones ni adherencias que se tradujeran en una menor eficiencia de recuperación, al contrario de lo que ocurre tras la recuperación repetida de embriones de coneja mediante laparotomía (Forcada and López, 2000).

Por otra parte, es necesario tener en cuenta que, tanto el transporte de los ovocitos como la contractibilidad oviductal están supeditados al control de los niveles de estrógenos y progesterona, los cuales pueden verse alterados por los tratamientos de superovulación (Suzuki and Tsutsumi, 1981; Ertzeid and Storeng, 2001; Greve and Callesen, 2001; Kelley *et al.*, 2006). Así, en algunas especies, incluido el conejo, se ha observado un aumento de la velocidad del transporte embrionario tras la estimulación con gonadotropinas (Tsutsumi and Hafez, 1974; Whyman and Moore, 1980; Akira *et al.*, 1993; Misra *et al.*, 1998). No obstante, no es el caso del presente trabajo, ya que no se apreciaron diferencias entre las eficiencias de recuperación de los ovocitos y embriones provenientes de hembras superovuladas o controles.

Por último, tan importante como la obtención de un gran número de ovocitos y embriones de calidad por hembra es su conservación a largo plazo. Las distintas estrategias de crioconservación se basan fundamentalmente en las sustancias crioprotectoras presentes en los medios y en las tasas de enfriamiento y calentamiento (Vajta and Kuwayama, 2006). La vitrificación es un procedimiento

simple y rápido que no requiere el empleo de equipos costosos y que proporciona buenos resultados de supervivencia embrionaria en conejo. No obstante, la composición de las soluciones crioprotectoras afectan a la viabilidad y al potencial de desarrollo de los embriones. Por ello, en el cuarto trabajo de esta tesis se planteó la optimización de la solución de vitrificación habitualmente utilizada por nuestro grupo de trabajo. Los crioprotectores permeables presentan distinto grado de toxicidad, de ahí que reducir la cantidad de éstos en una solución de vitrificación mediante la adición de polímeros podría mejorar las propiedades de la solución de vitrificación y aumentar la protección del embrión. Por lo que se planteó la utilización de polivinilalcohol (PVA), que actúa bloqueando la formación de cristales de hielo (Carroll *et al.*, 1993; Naitana *et al.*, 1997; Nowshari and Brem, 2000; Wowk *et al.*, 2000) y dextrano, que modifica la viscosidad del medio y reduce la tendencia a la rotura (Shaw *et al.*, 1997; Kuleshova *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en este último trabajo mostraron que la adición de dextrano tenía una acción protectora sobre las membranas celulares, lo que se debe probablemente a la formación de una matriz viscosa alrededor de los embriones que actuaría de barrera protectora (Rall, 1987; Shaw *et al.*, 1997) y además permitió reducir un 5% la cantidad empleada de dimetilsulfóxido en la solución de vitrificación. Sin embargo, la presencia de PVA no afectaba a la integridad de las membranas. En lo que se refiere al desarrollo embrionario *in vitro*, éste no parece verse afectado por la presencia de dextrano o PVA en la solución de vitrificación, no obstante, si consideramos el desarrollo embrionario sobre el total de embriones vitrificados, las soluciones con dextrano mejoraban significativamente los resultados. Cuando se redujo la cantidad de dimetilsulfóxido en la solución de vitrificación, la adición de PVA junto con el dextrano, mejoraba la eficacia total.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo ponen en evidencia que los embriones provenientes de hembras superovuladas son más sensibles al procedimiento de vitrificación, incrementándose el porcentaje de embriones dañados, resultados que coinciden con los obtenidos por otros autores (Kauffman *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2006). Sin embargo, el tratamiento de

superovulación empleado no afectó al desarrollo *in vitro* de los embriones. De los resultados de este trabajo, junto con los obtenidos en el primer trabajo de esta tesis en los que, tras la congelación lenta de embriones sometidos al mismo tratamiento superovulatorio no observamos ninguna diferencia en la viabilidad o desarrollo de los mismos, nos permitiría afirmar que el tratamiento con rhFSH no parece ejercer efecto negativo alguno sobre la calidad embrionaria *in vitro*, afectando únicamente en la mayor sensibilidad a la rotura de membranas durante el proceso de vitrificación. Serán necesarios posteriores trabajos para comprobar la eficiencia del método *in vivo*.

CONCLUSIONES

1.-La utilización de rhFSH en una cantidad de 1.8 µg diluido en PVP al 30%, administrada en tres días, es un método válido para estimular la superovulación en conejas.

2.-La utilización de PVP como vehículo para la administración de rhFSH supone una mejora en la manipulación de los animales manteniendo unas tasas de superovulación aceptables.

3.-La adición de rhLH al tratamiento de superovulación no supone un incremento ni en la tasa de ovulación obtenida, ni en la calidad de los embriones recuperados. Asimismo, la calidad de los embriones recuperados, en términos de criotolerancia, no se ve alterada por la estimulación con rhFSH.

4.-La repetición del tratamiento de superovulación con rhFSH se traduce en una disminución de la respuesta superovulatorio a partir del segundo ciclo y en un aumento de la respuesta inmunitaria frente a la FSH a partir del tercer ciclo.

5.-La administración de pFSH disuelta en suero salino, dividida en cinco inyecciones, resulta en una tasa de superovulación superior la obtenida tras la estimulación mediante el uso de rhFSH disuelta en un 30% de PVP dividida en tres inyecciones. Sin embargo, el primero de estos dos tratamientos provoca una disminución en la cantidad de ATP valorada en los ovocitos respecto al segundo.

6.-El método de recuperación de ovocitos mediante la técnica de laparoscopia es un método válido tanto para hembras superovuladas, como para hembras no superovuladas. Esta técnica puede repetirse a lo largo de, al menos, cuatro ciclos sin, por ello, disminuir su efectividad.

7.-La adición de dextrano a un medio de vitrificación basado en 20% de etilenglicol y el 20% de DMSO disminuye la tasa de rotura de embriones de 72 horas tras su vitrificación, permitiendo, por otra parte, disminuir la cantidad de DMSO utilizada sin perjudicar la calidad de los mismos.

REFERENCIAS

- Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Cantley, T. C., Prather, R. S. and Day, B. N. (1998) Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*, 50, 747-756.
- Adriaenssens, T., Segers, I., Wathlet, S. and Smits, J. (2010) The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation. *J Assist Reprod Genet*, 28, 31-40.
- Aggarwal, B. B., Farmer, S. W., Papkoff, H. and Seidel, G. E., Jr. (1980) Biochemical properties of equine chorionic gonadotrophin from two different pools of pregnant mare sera. *Biol Reprod*, 23, 570-576.
- Akira, S., Sanbuissho, A., Lin, Y. C. and Araki, T. (1993) Acceleration of embryo transport in superovulated adult rats. *Life Sci*, 53, 1243-1251.
- al-Hasani, S., Kirsch, J., Diedrich, K., Blanke, S., van der Ven, H. and Krebs, D. (1989) Successful embryo transfer of cryopreserved and in-vitro fertilized rabbit oocytes. *Hum Reprod*, 4, 77-79.
- Albertini, D. F., Combelles, C. M., Benecchi, E. and Carabatsos, M. J. (2001) Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 121, 647-653.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2003) *Biología Molecular de la Célula*, Ediciones Omega.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R. M., Rebollar, P. G., Nicodemus, N., Millán, P., Revuelta, L. and Lorenzo, P. L. (2010) Follicular, oocyte and embryo features related to metabolic status in primiparous lactating does fed with high-fibre rearing diets. *Reprod Domest Anim*, 45, e91-e100.
- Arias-Álvarez, M., López-Béjar, M., Rebollar, P. G., García-García, R. M. and Lorenzo, P. L. (2007) Patrones nucleares y citoplasmáticos durante la maduración in vitro de oocitos de coneja. In *XII Jornadas de Producción Animal AIDA-ITEA*, Vol. 103 Zaragoza, pp. 173-185.

- Armstrong, D. T. and Opavsky, M. A. (1988) Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*, 39, 511-518.
- Asakawa, T., Ishikawa, M., Shimizu, T. and Dukelow, W. R. (1988) The chromosomal normality of in vitro-fertilized rabbit oocytes. *Biol Reprod*, 38, 292-295.
- Azoury, J., Verlhac, M. H. and Dumont, J. (2009) Actin filaments: key players in the control of asymmetric divisions in mouse oocytes. *Biol Cell*, 101, 69-76.
- Bae, I. H. and Foote, R. H. (1975) Effects of hormones on the maturation of rabbit oocytes recovered from follicles of various sizes. *J Reprod Fertil*, 42, 357-360.
- Bae, I. H. and Foote, R. H. (1980) Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. *J Reprod Fertil*, 59, 11-13.
- Balash, J., Vidal, E., Penarrubia, J., Casamitjana, R., Carmona, F., Creus, M., Fabregues, F. and Vanrell, J. A. (2001) Suppression of LH during ovarian stimulation: analysing threshold values and effects on ovarian response and the outcome of assisted reproduction in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod*, 16, 1636-1643.
- Berlinguer, F., Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P. P., Rosati, I., Ledda, S. and Naitana, S. (2004) FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology*, 61, 1477-1486.
- Besenfelder, U., Haas, C. and Brem, G. (2000) Reproduction technology and gene transfer in rabbits. In 7th World Rabbit Congress.
- Besenfelder, U., Strouhal, C. and Brem, G. (1998) A method for endoscopic embryo collection and transfer in the rabbit. *Zentralbl Veterinarmed A*, 45, 577-579.
- Besenfelder, U., Theau-Clément, M., Mosslacher, G., (2002) The effect of light intensity and hormonal treatments to induce superovulation on embryo recovery programs in rabbits. In Joint Meetign Ispra, pp. 14.

- Boettcher, P. J., Stella, A., Pizzi, F. and Gandini, G. (2005) The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources. *Genet Sel Evol*, 37, 657-675.
- Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Rosati, I., Zedda, M. T., Leoni, G., Succu, S., Pau, S. and Ledda, S. (2007) Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*, 68, 1138-1149.
- Boiti, C., Castellini, C., Canali, C., Zampini, D. and Monaci, M. (1995) Long term effect of PMSG on rabbit does reproductive performance. *World Rabbit Science*, 3, 51-56.
- Bolet, G., Brun, J. M., Monnerot, M., Abeni, F., Arnal, C., Arnold, J., Bell, D., Bergoglio, G., Besenfelder, U., Bozse, S., Boucher, S., Chanteloup, N., Ducourouble, M. C., Durand-Tardif, M., Esteves, P. J., Ferrand, N., Gautier, A., Haas, C., Hewwitt, G., Jehl, N., Joly, T., Koehl, P. F., Laube, T., Lechevestrier, S., López, M., Masoero, G., Menigoz, J. J., Piccinin, R., Queney, G., Saleil, G., Surridge, A., Van der Loo, W., Vicente, J. S., Viudes De Castro, M. P., Virag, J. S. and Zimmermann, J. M. (2000) Evaluation and conservation of European rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*) genetic resources. First results and interferences. In 7th World Rabbit CongressValencia (España).
- Bouquet, M., Selva, J. and Auroux, M. (1993) Cryopreservation of mouse oocytes: mutagenic effects in the embryo? *Biol Reprod*, 49, 764-769.
- Bourdage, R. J. and Halbert, S. A. (1988) Distribution of embryos and 500-microm microspheres in the rabbit oviduct: controls for acute motion analysis during transport. *Biol Reprod*, 38, 282-291.
- Bourdillon, A., Chmitelin, F., Jarrin, D., Parez, V. and Rouillère, H. (1992) Effects of a PMSG treatment on breeding results of artificially inseminated rabbits. *J Appl Rabbit Res*, 15, 530-537.
- Brackett, B. G., Mills, J. A. and Jaitles, G. G., Jr. (1972) In vitro fertilization of rabbit ova recovered from ovarian follicles. *Fertil Steril*, 23, 898-909.
- Buhler, V. (2005) Polyvinylpyrrolidone Excipients For Pharmaceuticals:

Povidone, Crospovidone And Copovidone.

Cai, X. Y., Chen, G. A., Lian, Y., Zheng, X. Y. and Peng, H. M. (2005) Cryoloop vitrification of rabbit oocytes. *Hum Reprod*, 20, 1969-1974.

Caligara, C., Navarro, J., Vargas, G., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2001) The effect of repeated controlled ovarian stimulation in donors. *Hum Reprod*, 16, 2320-2323.

Carroll, J., Wood, M. J. and Whittingham, D. G. (1993) Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biol Reprod*, 48, 606-612.

Chappel, S. C. and Howles, C. (1991) Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process. *Hum Reprod*, 6, 1206-1212.

Checura, C. M. and Seidel, G. E., Jr. (2007) Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology*, 67, 919-930.

Chen, S. U., Lien, Y. R., Chao, K. H., Ho, H. N., Yang, Y. S. and Lee, T. Y. (2003) Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing--a review article. *Mol Cell Endocrinol*, 202, 101-107.

Cheng, H., Dooley, M. P., Hopkins, S. M., Anderson, L. L., Yibchok-anun, S. and Hsu, W. H. (1999) Development of rabbit embryos during a 96-h period of in vitro culture after superovulatory treatment under conditions of elevated ambient temperature. *Anim Reprod Sci*, 56, 279-290.

Chesne, P., Adenot, P. G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L. and Renard, J. P. (2002) Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 20, 366-369.

Chrenek, P., Makarevich, A., Vasicek, D., Laurincik, J., Bulla, J., Gajarska, T. and Rafay, J. (1998) Effects of superovulation, culture and microinjection on development of rabbit embryos in vitro. *Theriogenology*, 50, 659-666.

Cocero, M. J., Alabart, J. L., Hammami, S., Martí, J. I., Lahoz, B., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J. F. and Folch, J. (2011) The efficiency of in vitro ovine embryo production using an undefined

- or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reprod Domest Anim*, 46, 463-470.
- Combelles, C. M. and Albertini, D. F. (2003) Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. *Biol Reprod*, 68, 812-821.
- Contreras, D. A., Galina, C. S., Ávila, J. G., Asprón, M. P. and Moreno-Mendoza, N. (2008) A system to evaluate the quality of frozen embryos through short-term culture. *Anim Reprod Sci*, 106, 369-379.
- Cooke, S., Tyler, J. P. and Driscoll, G. L. (2003) Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod*, 18, 2397-2405.
- Cummins, J. M. (2002) The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. *Reprod Biomed Online*, 4, 176-182.
- D'Alessandro, A. G., Martemucci, G., Colonna, M. A., Borghese, A., Terzano, M. G. and Bellitti, A. (2001) Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Anim Reprod Sci*, 65, 255-264.
- D'Alessandro, A. G., Martemucci, G. and Taibi, L. (2005) How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, 63, 1764-1774.
- De Matos, D. G., Furnus, C. C. and Moses, D. F. (1997) Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod*, 57, 1420-1425.
- Donaldson, L. E. and Ward, D. N. (1986) Effects of luteinising hormone on embryo production in superovulated cows. *Vet Rec*, 119, 625-626.
- Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Munson, L., Brown, J. L. and Wildt, D. E. (1992) Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol Reprod*, 46, 972-980.

- Eddy, C. A., Balmaceda, J. P. and Pauerstein, C. J. (1978) Effect of resection of the ampullary-isthmic junction on estrogen induced tubal locking of ova in the rabbit. *Biol Reprod*, 18, 105-109.
- Edwards, L. J., Kind, K. L., Armstrong, D. T. and Thompson, J. G. (2005) Effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288, E845-851.
- Ertzeid, G. and Storeng, R. (2001) The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod*, 16, 221-225.
- Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A. and Meryman, H. T. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21, 407-426.
- Fair, T., Carter, F., Park, S., Evans, A. C. and Lonergan, P. (2007) Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. *Theriogenology*, 68 Suppl 1, S91-97.
- FAO (2007) Corporate Document Repository. Animal Genetic Resources Information. Anexo 2. Definiciones para su uso en la elaboración de los informes de los países y el suministro de datos de apoyo.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A. and Navarro, P. A. (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71, 836-848.
- Filicori, M. (1999) The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril*, 71, 405-414.
- Forcada, F. and López, M. (2000) Repeated surgical embryo recovery and embryo production in rabbits. *Anim Reprod Sci*, 64, 121-126.
- Fredericks, C. M., Anderson, W. R., Smith, C. E. and Mathur, R. S. (1982) Patterns of periovulatory oviductal motility and progesterone in the unanesthetized rabbit. *Biol Reprod*, 27, 340-350.
- Fujimoto, S., Pahlavan, N. and Dukelow, W. R. (1974) Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J Reprod Fertil*, 40, 177-181.

- García-García, R. M., Arias-Álvarez, M., Rebollar, P. G., Revuelta, L. and Lorenzo, P. L. (2009) Influence of different reproductive rhythms on serum estradiol and testosterone levels, features of follicular population and atresia rate, and oocyte maturation in controlled suckling rabbits. *Anim Reprod Sci*, 114, 423-433.
- García-Ximénez, F. and Vicente, J. S. (1992) Effect of ovarian cystic or haemorrhagic follicles on embryo recovery and survival after transfer in hCG-ovulated rabbits. *Reprod Nutr Dev*, 32, 143-149.
- García, M. L., Baselga, M., Viudes De Castro, M. P. and Vicente, J. S. (2003a) Reconstitución de una línea de conejos a partir de embriones criopreservados. *Arch. Zootec.*, 49, 81-86.
- García, M. L., Baselga, M., Viudes De Castro, M. P. and Vicente, J. S. (2003b) Reconstitución de una línea de conejos a partir de embriones criopreservados. *Arch. Zootec.*, 49, 84-86.
- García, M. L., Blumetto, O., Capra, G., Vicente, J. S. and Baselga, M. (2000) Vitrified embryo transfer of two selected Spanish rabbit lines to Uruguay. In 7th World Rabbit Congress, Vol. A Valencia (España), pp. 139-142.
- Gardner, D. K., Sheehan, C. B., Rienzi, L., Katz-Jaffe, M. and Larman, M. G. (2007) Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*, 67, 64-72.
- Gilchrist, R. B., Lane, M. and Thompson, J. G. (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14, 159-177.
- Gilchrist, R. B. and Thompson, J. G. (2007) Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 67, 6-15.
- González-Bulnes, A., García-García, R. M., Castellanos, V., Santiago-Moreno, J., Ariznavarreta, C., Domínguez, V., López-Sebastián, A., Tresguerres, J. A. and Cocero, M. J. (2003) Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod Nutr Dev*, 43, 17-28.

- González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M. J. and López-Sebastián, A. (2000) Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, 54, 1055-1064.
- Gook, D. A., Osborn, S. M. and Johnston, W. I. (1993) Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod*, 8, 1101-1109.
- Goovaerts, I. G., Leroy, J. L., Jorssen, E. P. and Bols, P. E. (2010) Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology*, 74, 1509-1520.
- Gosálvez, L. F., Rodríguez, J. M. and Díaz, P. (1985) Comportamiento sexual de la coneja en post-parto. In X Symposium Cunicultura Barcelona (Spain), pp. 29-43.
- Greve, T. and Callesen, H. (2001) Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod Nutr Dev*, 41, 451-459.
- Guthrie, H. D., Pursel, V. G. and Wall, R. J. (1997) Porcine follicle-stimulating hormone treatment of gilts during an altrenogest-synchronized follicular phase: effects on follicle growth, hormone secretion, ovulation, and fertilization. *J Anim Sci*, 75, 3246-3254.
- Haller, K., Mathieu, C., Rull, K., Matt, K., Bene, M. C. and Uiibo, R. (2005) IgG, IgA and IgM antibodies against FSH: serological markers of pathogenic autoimmunity or of normal immunoregulation? *Am J Reprod Immunol*, 54, 262-269.
- Haller, K., Salumets, A., Grigorova, M., Talja, I., Salur, L., Bene, M. C., Laan, M. and Uiibo, R. (2007) Putative predictors of antibodies against follicle-stimulating hormone in female infertility: a study based on in vitro fertilization patients. *Am J Reprod Immunol*, 57, 193-200.
- Hashimoto, S., Kimura, K., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Hirako, M., Kawaguchi, M., Iwata, H., Hirao, M., Kitada, K., Hirasawa, K. and Ueda, M. (2007) Responsiveness of rabbits to superovulation treatment by a single injection of follicle-stimulating hormone with aluminum hydroxide gel. *Mol Reprod Dev*, 74, 1208-1212.

- Hashimoto, S., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Takahashi, R., Ueda, M., Hirao, M., Kamei, M., Kitada, K. and Hirasawa, K. (2004) Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation treatment. *Exp Anim*, 53, 395-397.
- Hill, M. (1933) The growth and regression of follicles in the oestrous rabbit. *J Physiol*, 80, 174-178 171.
- Hillier, S. G. (2009) Paracrine support of ovarian stimulation. *Mol Hum Reprod*, 15, 843-850.
- Hirabayashi, M., Hirao, M., Takahashi, R., Kimura, K., Hirasawa, K., Ueda, M. and Hochi, S. (2000) Production of transgenic rabbits using centrifuged pronuclear zygotes. *J Vet Med Sci*, 62, 1047-1052.
- Hochi, S., Terao, T., Kamei, M., Kato, M., Hirabayashi, M. and Hirao, M. (2004) Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology*, 61, 267-275.
- Hodges, C. A., Ilagan, A., Jennings, D., Keri, R., Nilson, J. and Hunt, P. A. (2002) Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. *Hum Reprod*, 17, 1171-1180.
- Hodgson, J. B. and Pauerstein, C. J. (1976) Comparison of oviductal transport of fertilized and unfertilized ova after HCG or coitus-induced ovulation in rabbits. *Biol Reprod*, 14, 377-380.
- Hoffman, L.H.; Olson, G.E.; Carson, D.D.; Chilton, B.S. (1998) Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology*, 138, 266-271.
- Holt, W. V. and Pickard, A. R. (1999) Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod*, 4, 143-150.
- Houdebine, L. M. (2005) Relations between animal transgenesis and reproduction. *Reprod Nutr Dev*, 45, 363-376.

- Houghton, F. D., Hawkhead, J. A., Humpherson, P. G., Hogg, J. E., Balen, A. H., Rutherford, A. J. and Leese, H. J. (2002) Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod*, 17, 999-1005.
- Howles, C. M. (1996) Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Hum Reprod Update*, 2, 172-191.
- Illera, J. C., Lorenzo, P. L., Silvan, G., Munro, C. J., Illera, M. J. and Illera, M. (1997) Enzyme immunoassay for testosterone and androstenedione in culture medium from rabbit oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 47, 1375-1388.
- Jelinkova, L., Kubelka, M., Motlik, J. and Guerrier, P. (1994) Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbit oocytes. *Mol Reprod Dev*, 37, 210-215.
- Joly, T. (1997) Etablissement d'une cryobanque de semence ou d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez les mammifères domestiques: L'exemple du lapin (*Oryctolagus cuniculus*). In Institut National des Sciences Appliquées, Vol. Tesis Lyon.
- Joly, T., Vicente, J. S., Theau-Clément, M., García-Ximénez, F., Besenfelder, U. and Renard, J. (1996) Cryopreservation of genetic resources in rabbit species: practical application. In 6th World Rabbit Congress, Vol. 2 Toulouse, pp. 293-298.
- Jones, A., Van Blerkom, J., Davis, P. and Toledo, A. A. (2004) Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Hum Reprod*, 19, 1861-1866.
- Kagabu, S. and Umezu, M. (2006) Variation with age in the numbers of ovulated ova and follicles of Wistar-Imamichi adult rats superovulated with eCG-hCG. *Exp Anim*, 55, 45-48.
- Kanaya, H., Hashimoto, S., Teramura, T., Morimoto, Y., Matsumoto, K., Saeki, K., Iritani, A. and Hosoi, Y. (2007) Mitochondrial dysfunction of in vitro grown rabbit oocytes results in preimplantation embryo arrest after activation. *J Reprod Dev*, 53, 631-637.

- Kanayama, K., Endo, T. and Sakuma, Y. (1992) Simplification of superovulation induction in rabbits by means of human menopausal gonadotrophin dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Zentralbl Veterinarmed A*, 39, 798-800.
- Kanayama, K. and Osada, H. (2000) The yield of abnormal unfertilized eggs observed after repeated gonadotrophin-induced ovulation. *J Int Med Res*, 28, 24-27.
- Kanka, J. (2003) Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology*, 59, 3-19.
- Kasai, M., Hamaguchi, Y., Zhu, S. E., Miyake, T., Sakurai, T. and Machida, T. (1992) High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol Reprod*, 46, 1042-1046.
- Kauffman, R. D., Schmidt, P. M., Rall, W. F. and Hoeg, J. M. (1998) Superovulation of rabbits with FSH alters in vivo development of vitrified morulae. *Theriogenology*, 50, 1081-1092.
- Kelley, R. L., Kind, K. L., Lane, M., Robker, R. L., Thompson, J. G. and Edwards, L. J. (2006) Recombinant human follicle-stimulating hormone alters maternal ovarian hormone concentrations and the uterus and perturbs fetal development in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, E761-770.
- Kennelly, J. J. and Foote, R. H. (1965) Superovulatory Response of Pre- and Post-Pubertal Rabbits to Commercially Available Gonadotrophins. *J Reprod Fertil*, 9, 177-188.
- Kim, C. K., Im, K. S., Zheng, X. and Foote, R. H. (1989) In vitro capacitation and fertilizing ability of ejaculated rabbit sperm treated with lysophosphatidylcholine. *Gamete Res*, 22, 131-141.
- Kim, M. K., Hossein, M. S., Oh, H. J., Fibrianto, H. Y., Jang, G., Kim, H. J., Hong, S. G., Park, J. E., Kang, S. K. and Lee, B. C. (2007) Glutathione content of in vivo and in vitro matured canine oocytes collected from different reproductive stages. *J Vet Med Sci*, 69, 627-632.
- Kimura, K., Hirako, M., Iwata, H., Aoki, M., Kawaguchi, M. and Seki, M. (2007) Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology*, 68, 633-639.

- Kobayashi, K., Nagashima, H., Yamakawa, H., Kato, Y. and Ogawa, S. (1990) The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. *Theriogenology*, 33, 777-788.
- Kranzfelder, D., Korr, H., Mestwerdt, W., Maurer-Schultze, B. (1984) Folicle growth in the ovary of the rabbit after ovulation-inducing application of human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res*, 238, 611-620.
- Krisher, R. L. (2004) The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*, 82 E-Suppl, E14-23.
- Kruij, T. A. M., Cran D.G., Van Beneden, T.H., Dieleman, S.J. (1983) Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Res*, 8, 29-47.
- Kubelka, M., Motik, J., Fulka, J., Jr., Prochazka, R., Rimkevicova, Z. and Fulka, J. (1988) Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and P-aminobenzamidine block. *Gamete Res*, 19, 423-431.
- Kuleshova, L. L., MacFarlane, D. R., Trounson, A. O. and Shaw, J. M. (1999) Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38, 119-130.
- Laborde, N. P., Wolfsen, A. R. and Odell, W. D. (1981) Short loop feedback system for the control of follicle-stimulating hormone in the rabbit. *Endocrinology*, 108, 72-75.
- Lavara, R., Baselga, M. and Vicente, J. S. (2011) Does storage time in LN2 influence survival and pregnancy outcome of vitrified rabbit embryos? *Theriogenology*, 76, 652-657.
- Lavara, R., Mocé, E., Lavara, F., Viudes de Castro, M. P. and Vicente, J. S. (2005) Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, 64, 1130-1141.
- Lebas, F., Theau-Clément, M., Remy, B., Drion, P. and Beckers, J. (1996) Production of anti-PMSG antibodies and its relation to the productivity of rabbit does. *World Rabbit Science*, 4, 57-62.
- Lechniak, D. (2002) Quantitative aspect of gene expression analysis in mammalian oocytes and embryos. *Reprod Biol*, 2, 229-241.

- Lee, K. Y. and DeMayo, F. J. (2004) Animal models of implantation. *Reproduction*, 128, 679-695.
- Lee, S. T., Han, H. J., Oh, S. J., Lee, E. J., Han, J. Y. and Lim, J. M. (2006a) Influence of ovarian hyperstimulation and ovulation induction on the cytoskeletal dynamics and developmental competence of oocytes. *Mol Reprod Dev*, 73, 1022-1033.
- Lee, S. T., Kim, T. M., Cho, M. Y., Moon, S. Y., Han, J. Y. and Lim, J. M. (2005) Development of a hamster superovulation program and adverse effects of gonadotropins on microfilament formation during oocyte development. *Fertil Steril*, 83 Suppl 1, 1264-1274.
- Lee, S. T., Oh, S. J., Lee, E. J., Han, H. J. and Lim, J. M. (2006b) Adenosine triphosphate synthesis, mitochondrial number and activity, and pyruvate uptake in oocytes after gonadotropin injections. *Fertil Steril*, 86, 1164-1169.
- Leibo, S. P. (1977) Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. the freezing of mammalian embryos. In *Ciba Foundation Symposium Amsterdam*, pp. 69-92.
- Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P., Ledda, S. and Naitana, S. (2001) Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod Nutr Dev*, 41, 239-246.
- Leoni, G. G., Berlinguer, F., Succu, S., Bebbere, D., Mossa, F., Madeddu, M., Ledda, S., Bogliolo, L. and Naitana, S. (2008) A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Mol Reprod Dev*, 75, 373-382.
- Levi-Setti, P. E., Cavagna, M. and Bulletti, C. (2006) Recombinant gonadotrophins associated with GnRH antagonist (cetorelix) in ovarian stimulation for ICSI: comparison of r-FSH alone and in combination with r-LH. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 126, 212-216.
- Levy, D. P., Navarro, J. M., Schattman, G. L., Davis, O. K. and Rosenwaks, Z. (2000) The role of LH in ovarian stimulation: exogenous LH: let's design the future. *Hum Reprod*, 15, 2258-2265.
- Lin, T. A., Chen, C. H., Sung, L. Y., Carter, M. G., Chen, Y. E., Du, F., Ju, J. C. and Xu, J. (2011) Open-pulled straw vitrification differentiates cryotolerance of in vitro cultured rabbit embryos at the eight-cell stage. *Theriogenology*, 75, 760-768.

- Lindsell, C. E., Ratkumar, K., Manning, A. W., Emery, S. K., Mapletoft, R. J. and Murphy, B. D. (1986) Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. . 5, 167 (Abstract).
- Liu, C. T., Chen, C. H., Cheng, S. P. and Ju, J. C. (2002) Parthenogenesis of rabbit oocytes activated by different stimuli. *Anim Reprod Sci*, 70, 267-276.
- Liu, J. L., Kusakabe, H., Chang, C. C., Suzuki, H., Schmidt, D. W., Julian, M., Pfeffer, R., Bormann, C. L., Tian, X. C., Yanagimachi, R. and Yang, X. (2004) Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod*, 70, 1776-1781.
- Liu, S. Z., Yao, L. J., Jiang, M. X., Lei, Z. L., Zhang, L. S., Zhang, Y. L., Sun, Q. Y., Zheng, Y. L., Song, X. F. and Chen, D. Y. (2005) Apoptosis in rabbit embryos produced by fertilization or nuclear transfer with fibroblasts and cumulus cells. *Reproduction*, 130, 359-366.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T. and Boland, M. P. (2003) Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*, 38, 259-267.
- Lopes da Costa, L., Chagas e Silva, J. and Robalo Silva, J. (2001) Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*, 56, 65-77.
- López-Béjar, M. (1995) Evaluación de la viabilidad de embriones de conejo de diversos estadios preimplantaciones crioconservados mediante procedimientos de congelación rápida. Vol. Ph. D. Universitat Autònoma Barcelona, Barcelona.
- López-Béjar, M. and López-Gatius, F. (2002) Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology*, 58, 1541-1552.
- López, M., Forcada, F., Rodríguez, J.A., Martín, M., Zaragaza, L. (1993) Embryo recovery under anesthesia after hCG treatments in the rabbit and survival when a reduced number of embryos is transferred. *World Rabbit Science*, 1, 127-132.

- Lorenzo, P. L., Illera, J. C., Silvan, G., Munro, C. J., Illera, M. J. and Illera, M. (1997) Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. *J Reprod Immunol*, 35, 11-29.
- Lorenzo, P. L., Rebollar, P. G., Illera, M. J., Illera, J. C., Illera, M. and Alvariño, J. M. R. (1996) Characterization of rabbit follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Arch. Zootec.*, 45, 25-35.
- Loseke, A. and Spanel-Borowski, K. (1996) Simple or repeated induction of superovulation: a study on ovulation rates and microvessel corrosion casts in ovaries of golden hamsters. *Ann Anat*, 178, 5-14.
- Lubbadeh, W. F., Graves, C. N. and Spahr, S. L. (1980) Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows. *J Anim Sci*, 50, 124-127.
- Luberda, Z. (2005) The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*, 5, 5-17.
- Maertens, L. and Luzi, F. (1995) Effect of diluent and storage time of rabbit semen on the fertility of does reared under two different lighting schedule. *World Rabbit Science*, 3, 27-34.
- Magarey, G. M., Rodger, J. C., Buist, J. M. and Mate, K. E. (2003) Effects of repeated superovulation and surgical oocyte collection on ovarian response and natural breeding ability of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Reproduction*, 125, 701-707.
- Makarevich, A. V., Olexikova, L., Chrenek, P., Kubovicova, E., Freharova, K. and Pivko, J. (2007) The effect of hyperthermia in vitro on vitality of rabbit preimplantation embryos. *Physiol Res*, 56, 789-796.
- Mandelbaum, J., Anastasiou, O., Levy, R., Guerin, J. F., de Larouziere, V. and Antoine, J. M. (2004) Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 113 Suppl 1, S17-23.
- Marsafy, Y. M. and Hafez, E. S. (1981) Egg transport and postcoital isthmic contractility in the rabbit. *J Reprod Med*, 26, 558-562.
- Massip, A. (2001) Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim*, 36, 49-55.

- Maurer, R. R. and Haseman, J. K. (1976) Freezing morula stage rabbit embryos. *Biol Reprod*, 14, 256-263.
- Maurer, R. R., Hunt, W. L. and Foote, R. H. (1968) Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in Dutch-belted rabbits. *J Reprod Fertil*, 15, 93-103.
- Medjdoub, N., Forcada, F., López, M. (2000) Embryo production from repeated induction of ovulation in Gigante de España does. . In 7th World Rabbit Congress, Vol. A Valencia, España, pp. 191-195.
- Mehaisen, G. M. (2005) Embryo cryopreservation program in a rabbit line selected by growth rate: superovulation and in vivo embryo recovery protocols. In Departamento Ciencia Animal Universidad Politécnica Valencia.
- Mehaisen, G. M., Vicente, J. S. and Lavara, R. (2004) In vivo embryo recovery rate by laparoscopic technique from rabbit does selected for growth rate. *Reprod Domest Anim*, 39, 347-351.
- Mehaisen, G. M., Vicente, J. S., Lavara, R. and Viudes-de-Castro, M. P. (2005) Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci*, 90, 175-184.
- Mehaisen, G. M., Viudes-de-Castro, M. P., Vicente, J. S. and Lavara, R. (2006) In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*, 65, 1279-1291.
- Mehlmann, L. M. (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130, 791-799.
- Meldrum, D. R., Silverberg, K. M., Bustillo, M. and Stokes, L. (1998) Success rate with repeated cycles of in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 69, 1005-1009.
- Menezes, Y. and Guerin, P. (1997) The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 73, 99-104.
- Mermillod, P., Oussaid, B. and Cognie, Y. (1999) Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, 54, 449-460.

- Merton, J. S., de Roos, A. P., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. and Dieleman, S. J. (2003) Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59, 651-674.
- Mikhail, G., Noall, M. W. and Allen, W. M. (1961) Progesterone levels in the rabbit ovarian vein blood throughout pregnancy. *Endocrinology*, 69, 504-509.
- Misra, A. K., Kasiraj, R., Rao, M. M., Rangareddy, N. S., Jaiswal, R. S. and Pant, H. C. (1998) Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 50, 637-649.
- Miyake, T., Kasai, M., Zhu, S. E., Sakurai, T. and Machida, T. (1993) Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology*, 40, 121-134.
- Moor, R. M., Kruip, A. M. and Green, D. (1984) Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? *Theriogenology*, 21, 103-116.
- Murphy, B. D., Mapletoft, R. J., Manns, J. and Humphrey, W. D. (1984) Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 25, 117-125.
- Nagai, S., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Kasai, T., Yokota, S., Shitara, H., Yonekawa, H. and Hoshi, K. (2006) Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med*, 210, 137-144.
- Naik, B. R., Rao, B. S., Vagdevi, R., Gnanprakash, M., Amarnath, D. and Rao, V. H. (2005) Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. *Anim Reprod Sci*, 86, 329-338.
- Naitana, S., Ledda, S., Loi, P., Leoni, G., Bogliolo, L., Dattena, M. and Cappai, P. (1997) Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim Reprod Sci*, 48, 247-256.

- Nasr-Esfahani, M. M. and Johnson, M. H. (1991) The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. *Development*, 113, 551-560.
- Naturil-Alfonso, C., Saenz-de-Juano, M. D., Peñaranda, D. S., Vicente, J. S. and Marco-Jiménez, F. (2011) Parthenogenic blastocysts cultured under in vivo conditions exhibit proliferation and differentiation expression genes similar to those of normal embryos. *Anim Reprod Sci*, 127, 222-228.
- Norwood, J. T. and Anderson, R. G. (1980) Evidence that adhesive sites on the tips of oviduct cilia membranes are required for ovum pickup in situ. *Biol Reprod*, 23, 788-791.
- Nowshari, M. A. and Brem, G. (2000) The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 53, 1157-1166.
- Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Mochida, K., Hatori, M., Okada, H., Takeiri, S., Shimosawa, N., Nagashima, H., Sankai, T. and Ogura, A. (2005) Differential development of rabbit embryos following microinsemination with sperm and spermatids. *Mol Reprod Dev*, 72, 411-417.
- Olijve, W., de Boer, W., Mulders, J. W. and van Wezenbeek, P. M. (1996) Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol Hum Reprod*, 2, 371-382.
- Osada, H., Fujii, T. K., Tsunoda, I., Takagi, K., Satoh, K., Kanayama, K. and Endo, T. (1999) Fimbrial capture of the ovum and tubal transport of the ovum in the rabbit, with emphasis on the effects of beta 2-adrenoreceptor stimulant and prostaglandin F2 alpha on the intraluminal pressures of the tubal ampullae. *J Assist Reprod Genet*, 16, 373-379.
- Ozil, J. P. and Huneau, D. (2001) Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca²⁺ signal regime on development. *Development*, 128, 917-928.
- Papis, K., Sypecka, J., Korwin-Kossakowski, M., Wenta-Muchalska, E. and Bilska, B. (2005) Banking of embryos of mutated, paralytic tremor rabbit by means of vitrification. *Lab Anim*, 39, 284-289.

- Parrish, J. J. and Foote, R. H. (1986) Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol Reprod*, 35, 253-257.
- Pau, C. Y., Pau, K. Y., Berria, M. and Spies, H. G. (2000) Ovarian influence on gonadotropin and prolactin release in mated rabbits. *Endocrine*, 13, 25-35.
- Pau, K. Y. and Spies, H. G. (1986) Estrogen-dependent effects of norepinephrine on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release in the rabbit. *Brain Res*, 399, 15-23.
- Penarrubia, J., Fabregues, F., Creus, M., Manau, D., Casamitjana, R., Guimera, M., Carmona, F., Vanrell, J. A. and Balasch, J. (2003) LH serum levels during ovarian stimulation as predictors of ovarian response and assisted reproduction outcome in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod*, 18, 2689-2697.
- Popova, E., Bader, M. and Krivokharchenko, A. (2005) Strain differences in superovulatory response, embryo development and efficiency of transgenic rat production. *Transgenic Res*, 14, 729-738.
- Prentice, J. R. and Anzar, M. (2011) Cryopreservation of Mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Vet Med Int*, 2011.
- Rall, W. F. (1987) Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24, 387-402.
- Renard, J. P., Garnier, V. and Parvex, I. C. (1982) Production et congélation de l'embryon de lapin. In *3er Journées de la Recherche Cunicole*(Ed, INRA-ITAVI) Paris, pp. 818.
- Revelli, A., Poso, F., Gennarelli, G., Moffa, F., Grassi, G. and Massobrio, M. (2006) Recombinant versus highly-purified, urinary follicle-stimulating hormone (r-FSH vs. HP-uFSH) in ovulation induction: a prospective, randomized study with cost-minimization analysis. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 38.
- Rieger, D. (1997) Batch analysis of the ATP content of bovine sperm, oocytes, and early embryos using a scintillation counter to measure the chemiluminescence produced by the luciferin-luciferase reaction. *Anal Biochem*, 246, 67-70.

- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Perez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P. and Lonergan, P. (2003) Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 68, 236-243.
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M. P., Arroyo-García, R., Pintado, B., de la Fuente, J. and Gutiérrez-Adán, A. (2002) Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod*, 66, 589-595.
- Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis, L. K., Plancha, C. E. and Albertini, D. F. (2008) Oogenesis: Prospects and challenges for the future. *J Cell Physiol*, 216, 355-365.
- Rosas, C. A., Alberio, R. H., Baranao, J. L., Agüero, A. and Chaves, M. G. (1998) Evaluation of two treatments in superovulation of mares. *Theriogenology*, 49, 1257-1264.
- Rose, M. P., Gaines Das, R. E. and Balen, A. H. (2000) Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev*, 21, 5-22.
- Roy, F., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E. P., Pobel, T., Deletang, F., Combarous, Y., Guillou, F. and Maurel, M. C. (1999) Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biol Reprod*, 61, 209-218.
- Rubianes, E., Ungerfeld, R., Vinales, C., Rivero, A. and Adams, G. P. (1997) Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*, 47, 1479-1488.
- Ruffing, N. A., Steponkus, P. L., Pitt, R. E. and Parks, J. E. (1993) Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology*, 30, 562-580.

- Saenz-de-Juano, M. D., Peñaranda, D. S., Marco-Jiménez, F., Llobat, L. and Vicente, J. S. (2011) Differential mRNA expression in rabbit in vivo pre-implantatory embryos. *Reprod Domest Anim*, 46, 567-572.
- Saha, S., Otoi, T., Takagi, M., Boediono, A., Sumantri, C. and Suzuki, T. (1996) Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*, 33, 291-299.
- Salomy, M. and Harper, M. J. (1971) Cyclical changes of oviduct motility in rabbits. *Biol Reprod*, 4, 185-194.
- Salveti, P. (2008) Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine: Application à la gestion des ressources génétiques. In *Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Sante*, Vol. Tesis Université Claude Bernard, Lyon.
- Salveti, P., Buff, S., Afanassieff, M., Daniel, N., Guerin, P. and Joly, T. (2010) Structural, metabolic and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing. *Theriogenology*, 74, 847-855.
- Salveti, P., Joly, T. and Renard, J. P. (2007a) Viability of rabbit embryos after 14 years storage in liquid nitrogen. Abstract. In *CRYO 2007: The 44th Annual meeting of The Society for Cryobiology* Vol. 55 Lake Louise (Canada), pp. 364.
- Salveti, P., Theau-Clément, M., Beckers, J. F., Hurtaud, J., Guerin, P., Neto, V., Falières, J. and Joly, T. (2007b) Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67, 1185-1193.
- Santacreu, M. A., Argente, M. J., Mocé, M. L. and Blasco, A. (2000) Selection for uterine capacity II. Response to selection estimated with a cryopreserved control population. . In *7th World Rabbit Congress*, Vol. A Valencia (España), pp. 491-496.
- Santacreu, M. A., Viudes de Castro, P. and Blasco, A. (1990) [Evaluation by celioscopy of the corpus luteum and embryos. Influence on litter size in the rabbit]. *Reprod Nutr Dev*, 30, 583-588.

- Santos-Ramos, B. and Guerrero-Aznar, M. D. (1994) Administración de medicamentos. Teoría y práctica., Díaz de Santos Editorial.
- Saragusty, J. and Arav, A. (2011) Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141, 1-19.
- Seidel, G. E., Jr. (2006) Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, 65, 228-235.
- Seitz, H. M., Jr., Brackett, B. G. and Mastroianni, L., Jr. (1970) In vitro fertilization of ovulated rabbit ova recovered from the ovary. *Biol Reprod*, 2, 262-267.
- Sengoku, K. and Dukelow, R. W. (1988) Gonadotropin effects on chromosomal normality of hamster preimplantation embryos. *Biol Reprod*, 38, 150-155.
- Shatavi, S. V., Llanes, B. and Luborsky, J. L. (2006) Association of unexplained infertility with gonadotropin and ovarian antibodies. *Am J Reprod Immunol*, 56, 286-291.
- Shaw, J. M. and Jones, G. M. (2003) Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*, 9, 583-605.
- Shaw, J. M., Kuleshova, L. L., MacFarlane, D. R. and Trounson, A. O. (1997) Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology*, 35, 219-229.
- Shaw, J. M., Oranratnachai, A. and Trounson, A. O. (2000) Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53, 59-72.
- Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O. E., Carou, N., Alberio, R. H., Abecia, J. A. and Palacín, I. (2008) Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Anim Reprod Sci*, 104, 227-237.
- Singh, R. and Sinclair, K. D. (2007) Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology*, 68 Suppl 1, S56-62.
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P. and Robert, C. (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65, 126-136.

- Smorag, Z., Gajda, B., Wieczorek, B. and Jura, J. (1989) Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31, 1227-1231.
- Sohn, I. P., Ahn, H. J., Park, D. W., Gye, M. C., Jo, D. H., Kim, S. Y., Min, C. K. and Kwon, H. C. (2002) Amelioration of mitochondrial dysfunction and apoptosis of two-cell mouse embryos after freezing and thawing by the high frequency liquid nitrogen infusion. *Mol Cells*, 13, 272-280.
- Soler, E., Le Saux, A., Guinut, F., Passet, B., Cohen, R., Merle, C., Charpilienne, A., Fourgeux, C., Sorel, V., Piriou, A., Schwartz-Cornil, I., Cohen, J. and Houdebine, L. M. (2005) Production of two vaccinating recombinant rotavirus proteins in the milk of transgenic rabbits. *Transgenic Res*, 14, 833-844.
- Sommerfeld, V. and Niemann, H. (1999) Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38, 95-105.
- Spikings, E. C., Alderson, J. and St John, J. C. (2007) Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol Reprod*, 76, 327-335.
- Spilman, C. H., Shaikh, A. A. and Harper, M. J. (1978) Oviductal motility amplitude and ovarian steroid secretion during egg transport in the rabbit. *Biol Reprod*, 18, 409-417.
- Squires, E. L. and McCue, P. M. (2007) Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci*, 99, 1-8.
- Stenbak, T. K., Redmer, D. A., Berginski, H. R., Erickson, A. S., Navanukraw, C., Toutges, M. J., Bilski, J. J., Kirsch, J. D., Kraft, K. C., Reynolds, L. P. and Grazul-Bilska, A. T. (2001) Effects of follicle stimulating hormone (FSH) on follicular development, oocyte retrieval, and in vitro fertilization (IVF) in ewes during breeding season and seasonal anestrus. *Theriogenology*, 56, 51-64.
- Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P. B. and Wolf, E. (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*, 64, 904-909.

- Stroud, B. and Hasler, J. F. (2006) Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*, 65, 65-76.
- Sugano, M. and Shinogi, T. (1999) Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Anim Reprod Sci*, 55, 175-181.
- Suzuki, H. and Tsutsumi, Y. (1981) Intraluminal pressure changes in the oviduct, uterus, and cervix of the mated rabbit. *Biol Reprod*, 24, 723-733.
- Swanson, W. F., Roth, T. L., Graham, K., Horohov, D. W. and Godke, R. A. (1996) Kinetics of the humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. *Am J Vet Res*, 57, 302-307.
- Tain, C. F., Goh, V. H. and Ng, S. C. (2000) Effects of hyperstimulation with gonadotrophins and age of females on oocytes and their metaphase II status in rats. *Mol Reprod Dev*, 55, 104-108.
- Takagi, M., Kim, I. H., Izadyar, F., Hyttel, P., Bevers, M. M., Dieleman, S. J., Hendriksen, P. J. and Vos, P. L. (2001) Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reproduction*, 121, 941-951.
- Tamassia, M., Nuttinck, F., May-Panloup, P., Reynier, P., Heyman, Y., Charpigny, G., Stojkovic, M., Hiendleder, S., Renard, J. P. and Chastant-Maillard, S. (2004) In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol Reprod*, 71, 697-704.
- Telford, N. A., Watson, A. J. and Schultz, G. A. (1990) Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*, 26, 90-100.
- Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Johnson, A. L. and Hsueh, A. J. (1991) Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129, 2799-2801.
- Torner, H., Ghanem, N., Ambros, C., Holker, M., Tomek, W., Phatsara, C., Alm, H., Sirard, M. A., Kanitz, W., Schellander, K. and Tesfaye, D. (2008) Molecular and subcellular characterisation of

- oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction*, 135, 197-212.
- Torres, S. (1982) Etude de la mortalité embryonnaire chez la lapine. In 3èmes Journées de la Recherche cunicole, Vol. 15 Paris
- Torres, S. and Sevellec, C. (1987) Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reprod Nutr Dev*, 27, 859-863.
- Tosti, E. (2006) Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 26.
- Tsiligianni, T., Saratsi, A., Besenfelder, U., Anastasiadis, A., Vainas, E., Saratsis, P. and Brem, G. (2004) The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation. *Theriogenology*, 61, 989-995.
- Tsutsumi, Y. and Hafez, E. S. (1974) Distribution patterns of rabbit embryos during preimplantation stage. *J Morphol*, 144, 323-336.
- Tsutsumi, Y., Takada, T., Suzuki, H., Iwasaky, Y., Inada, K., Minami, T., (1980) Peripheral serum levels of progesterone and prostaglandin F2a during egg transport in superovulated rabbits. *Jap J Anim Reprod*, 26, 15-33.
- Tucker, M., Morton, P. and Liebermann, J. (2004) Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 113 Suppl 1, S24-27.
- Vajta, G. (2000) Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*, 60-61, 357-364.
- Vajta, G. and Kuwayama, M. (2006) Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65, 236-244.
- Van Blerkom, J. (1991) Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5031-5035.

- Van Blerkom, J. (2004) Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*, 128, 269-280.
- Van Blerkom, J. (2008) Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reprod Biomed Online*, 16, 553-569.
- Van Blerkom, J. (2010) Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, 11, 797-813.
- Van Blerkom, J., Cox, H. and Davis, P. (2006) Regulatory roles for mitochondria in the pre-implantation mouse blastocyst: possible origins and developmental significance of differential $\Delta\Psi_m$. *Reproduction*, 131, 961-976.
- Van Blerkom, J. and Davis, P. (2001) Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod*, 16, 757-764.
- Van Blerkom, J. and Davis, P. (2007) Mitochondrial signaling and fertilization. *Mol Hum Reprod*, 13, 759-770.
- Van Blerkom, J., Davis, P. and Alexander, S. (2003) Inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocytes. *Hum Reprod*, 18, 2429-2440.
- Van Blerkom, J., Davis, P., Mathwig, V. and Alexander, S. (2002) Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod*, 17, 393-406.
- Van Blerkom, J., Davis, P. W. and Lee, J. (1995) ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod*, 10, 415-424.

- van Cappellen, W. A., Kramer, P., van Leeuwen, E. C., de Leeuw, R. and de Jong, F. H. (1997) Induction of superovulation in cyclic rats by administration of decreasing doses of recombinant follicle stimulating hormone (Org32489). *Hum Reprod*, 12, 224-230.
- Van der Auwera, I. and D'Hooghe, T. (2001) Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod*, 16, 1237-1243.
- Van der Elst, J. (2003) Oocyte freezing: here to stay? *Hum Reprod Update*, 9, 463-470.
- Veiga-López, A., González-Bulnes, A., Tresguerres, J. A., Domínguez, V., Ariznavarreta, C. and Cocero, M. J. (2006) Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Domest Anim Endocrinol*, 30, 76-87.
- Velez-Pardo, C., Morales, A. T., Del Rio, M. J. and Olivera-Angel, M. (2007) Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappaB and p53 activation in bovine embryos. *Theriogenology*, 67, 1285-1296.
- Vicente, J. S. and García-Ximénez, F. (1993) Effect of recipient doe genotype on survival rate at birth of frozen rabbit embryos. *Reprod Nutr Dev*, 33, 229-234.
- Vicente, J. S. and García-Ximénez, F. (1994) Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenology*, 42, 1205-1215.
- Vicente, J. S., Viudes-De-Castro, M. P., García ML. and Baselga, M. (2003) Effect of rabbit line on a program of cryopreserved embryos by vitrification. *Reprod Nutr Dev*, 43, 137-143.
- Vincent, C., Garnier, V., Heyman, Y. and Renard, J. P. (1989) Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fertil*, 87, 809-820.
- Wang, L. Y., Wang, D. H., Zou, X. Y. and Xu, C. M. (2009) Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10, 483-492.
- Watson, A. J. (2007) Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci*, 85, E1-3.

- Whyman, D. and Moore, R. W. (1980) Effects of PMSG and the prostaglandin F-2 alpha analogue, cloprostenol, on superovulation, fertilization and egg transport in the ewe. *J Reprod Fertil*, 60, 267-272.
- Wowk, B., Leitl, E., Rasch, C. M., Mesbah-Karimi, N., Harris, S. B. and Fahy, G. M. (2000) Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, 40, 228-236.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D. and Niemann, H. (2007) Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68 Suppl 1, S77-83.
- Yamamoto, Y., Sofikitis, N. and Miyagawa, I. (1999) Ooplasmic injections of rabbit round spermatid nuclei or intact round spermatids from fresh, cryopreserved and cryostored samples. *Hum Reprod*, 14, 1506-1515.
- Yang, C. X., Kou, Z. H., Wang, K., Jiang, Y., Mao, W. W., Sun, Q. Y., Sheng, H. Z. and Chen, D. Y. (2004) Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed by rabbit oocytes. *Reproduction*, 127, 201-205.
- Yang, S., Shen, Y., Niu, Y., Hildebrandt, T. B., Jewgenow, K., Goeritz, F., He, X., Zhou, Q. and Ji, W. (2008) Effects of rhFSH regimen and time interval on ovarian responses to repeated stimulation cycles in rhesus monkeys during a physiologic breeding season. *Theriogenology*, 70, 108-114.
- Yang, X., Jiang, S., Kovacs, A. and Foote, R. H. (1992) Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. *Biol Reprod*, 47, 636-643.
- Yu, X. F., Cho, S. J., Bang, J. I., Lee, H. S., Lee, Y. S., Kwon, T. H., Deb, G. K. and Kong, I. K. (2010) Effect of equine chorionic gonadotropin on the efficiency of superovulation induction for in vivo and in vitro embryo production in the cat. *Theriogenology*, 73, 413-420.
- Zanagnolo, V., Dharmarajan, A. M., Hesla, J. and Wallach, E. E. (1996) Effects of a gonadotropin-releasing hormone analog on rabbit ovarian function. *Endocrinology*, 137, 5400-5406.
- Zeng, S. M., Zhu, S. E., Wang, Y. S., Chen, X. J., Zhang, Z. C. and Chen, Y. F. (1999) An efficient method for in vitro fertilization in rabbits. *Anim Biotechnol*, 10, 15-23.

- Zhang, Y. L., Chen, T., Jiang, Y., Zhong, Z. S., Liu, S. Z., Hou, Y., Schatten, H., Chen, D. Y. and Sun, Q. Y. (2005) Active demethylation of individual genes in intracytoplasmic sperm injection rabbit embryos. *Mol Reprod Dev*, 72, 530-533.
- Zhao, Z. J., Ouyang, Y. C., Nan, C. L., Lei, Z. L., Song, X. F., Sun, Q. Y. and Chen, D. Y. (2006) Rabbit oocyte cytoplasm supports development of nuclear transfer embryos derived from the somatic cells of the camel and Tibetan antelope. *J Reprod Dev*, 52, 449-459.
- Zheng, Y. L., Jiang, M. X., Zhang, Y. L., Sun, Q. Y. and Chen, D. Y. (2004) Effects of oocyte age, cumulus cells and injection methods on in vitro development of intracytoplasmic sperm injection rabbit embryos. *Zygote*, 12, 75-80.