

Resum

La crioconservació dels embrions per congelació o vitrificació redueix la supervivència dels embrions de conill (*Oryctolagus cuniculus*) entre un 20 i 50% depenent de la stirp genètica i el procediment utilitzat. En embrions vitrificats de conill s'ha observat una elevada mortalitat darrere la implantació, que sugeria que el procés té efectes tardans i negatius sobre el desenvolupament fetal. L'objectiu de la tesi fou estudiar el transcryptoma embrionari previ a la implantació (6 dies) i el desenvolupament embrionari i fetal d'embrions de conill crioconservats mitjançant dos procediments habituals en aquesta espècie.

Específicament, l'objectiu del capítol I va ser l'avaluació dels canvis produïts en el perfil d'expressió gènica pel procediment de congelació en embrions viables de 6 dies de desenrotllament, i relacionar-la amb les taxes d'implantació i naixement. Per a això, avaluem primer la distribució de pèrdues durant la gestació per mitjà de l'anàlisi de l'habilitat per a desenrotllar-se a blastocisto tardà, per a implantar-se i per a acabar la gestació. Després, duem a terme una anàlisi microarray dos colors en què usant una plataforma genèrica de conill comparem els transcriptomas dels embrions de 6 dies prèviament congelats i transferits amb els embrions desenrotllats in vivo. Comparat amb els controls, es van obtenir taxes d'implantació i naixement més baixes per als embrions congelats. Així mateix, també es van observar diferències a nivell d'expressió, i els embrions viables de 6 dies del grup congelat van presentar 70 gens diferencialment expressats. Esta va ser la primera aproximació que ens va proporcionar una llista de gens candidats que podrien provocar fallades en el diàleg matern-embriònic, implantació i formació de la placenta.

El capítol II avalà la distribució de pèrdues durant la gestació degudes al procés de vitrificació. No obstant això, en este cas, per a avaluar els efectes de la vitrificació sobre l'expressió gènica de blastocistos tardans usem la tècnica de PCR quantitativa (qPCR) amb 10 gens candidats, triats per estar diferencialment expressats en els embrions congelats de l'anterior treball (*SCGB1A1*, *EMP1*, *C1QTNF1*, *ANXA3*, *EGFLAM* i *TNFAIP6*), o pel seu rol en el desenrotllament embrionari i implantació (*OCT4*, *VEGF*, *HBA* i *LAMA4*). A més, vam introduir també dades ecogràfiques sobre la grandària del sac embriònic, fetus, la placenta fetal i materna des del dia 10 fins al 14 de gestació. Els resultats van mostrar dos pics principals de pèrdues durant la gestació: Un situat abans de la implantació i l'altre després. Així mateix, també detectem una reducció en la grandària del fetus i de la placenta materna entre els dies 10 i 14. Finalment, vam poder observar que,

comparat amb els embrions de 6 dies desenrotllats en condicions *in vivo*, l'expressió relativa dels transcrits *SCGB1A1*, *EMP1*, *C1QTNF1*, *ANXA3*, *EGFLAM* i *TNFAIP6* estava significativament alterada en els embrions vitrificats, seguint a més el patró prèviament observat en els embrions congelats.

Al capítol III es compararen directament els transcriptome d'embrions de 6 dies prèviament vitrificats o congelats. Seguint els mateixos procediments que en els treballs anteriors, avaluem la distribució de pèrdues al llarg de la gestació analitzant les taxes de desenrotllament a blastocisto tardà, implantació i naixement. Així mateix, emprant la mateixa plataforma genèrica microarray del primer experiment realitzem una anàlisi dos colors microarray en el que comparem directament el perfil transcriptòmic a dia 6 de desenrotllament d'embrions congelats i vitrificats. Els resultats van reportar que la congelació i la vitrificació tenen els mateixos efectes danyosos sobre el desenrotllament a dia 6, però la distribució de pèrdues difereix durant la implantació i el desenrotllament, sent les taxes d'implantació i naixement majors per al grup vitrificat. Les similituds a dia 6 de desenrotllament també es van reflectir en el patró d'expressió gènica, perquè no es van detectar diferències a nivell transcriptòmic entre els dos tipus d'embrions.

Al capítol IV es s'analitzà el transcriptoma d'embrions vitrificats de 6 dies i placentes fetals de 14 dies front al transcriptoma d'embrions i placentes control no vitrificades però si transferides, aïllant així l'efecte de la vitrificació. Al igual que observarem al capítol II, els embrions vitrificats que eren capaços d'arribar a l'estadi de blastocisto tardà, eren també capaços d'implantar, però no tots els embrions implantats tenien l'habilitat de finalitzar la gestació. Tenint en compte els resultats de les ecografies del treball anterior, prenem dades del pes del fetus, la placenta fetal i materna a dia 14 de desenrotllament i del pes al naixement. En els resultats detectem un descens en els pesos del fetus i la placenta materna, així com un increment en el pes al naixement dels embrions vitrificats. En este experiment, per a l'avaluació de l'expressió gènica vam introduir unes quantes modificacions en el disseny experimental. Així, fem una plataforma microarray específica per a embrió de conill, i realitzem una anàlisi microarray d'un color. A més, a banda dels embrions de 6 dies analitzem també placentes fetals de 14 dies, i com a referència control fem embrions que no havia sigut crioconservats però sí que transferits a femelles receptores. En el cas dels embrions de 6 dies no trobem diferències significatives en l'expressió gènica, però en el cas de les placentes identifiquem 60 gens sobreexpressats. Arribats a aquest punt, vam ser un pas més enllà, i realitzem una anàlisi 2D-DIGE per a trobar diferències a nivell proteòmic. Així, detectem 89 proteïnes diferencials entre les placentes de 14 dies de desenrotllament derivades d'embrions vitrificats.

A causa dels anteriors resultats d'alteracions a nivell transcriptòmic i proteòmic en les placentes pocs dies després de la implantació, el capítol V el centrarem en l'estudi de les

alteracions proteòmiques en placentes fetals de 24 dies de desenrotllament. En este treball vam pretendre comparar els perfils proteics de placentes fetals d'embrions vitrificats i controls en l'última part de la gestació, pocs dies abans del naixement. Després de realitzar una anàlisi 2D-DIGE trobem que hi havia 32 proteïnes diferencialment expressades entre els grups experimentals. Estos resultats van demostrar que la vitrificació induïx canvis substancials en l'expressió de proteïnes placentàries al final de la gestació, i que a banda de les conseqüències a curt termini, la crioconservació embrionària pot provocar conseqüències a llarg termini en eixos fetus que al final naixen.