

Resumen

La crioconservación de los embriones por congelación o vitrificación reduce la supervivencia de los embriones de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) entre un 20 y 50% dependiendo de la estirpe genética y el procedimiento utilizado. En embriones vitrificados de conejo se ha observado un elevada mortalidad tras la implantación que sugeriría que el proceso tiene efectos tardíos y negativos sobre el desarrollo fetal. El objetivo de la tesis fue estudiar el transcriptoma embrionario previo a la implantación (6 días) y el desarrollo embrionario y fetal de embriones de conejo crioconservados mediante dos procedimientos habituales en esta especie.

Específicamente, el objetivo del capítulo I fue la evaluación de los efectos del procedimiento de congelación sobre el desarrollo y expresión génica de embriones de conejo. Para ello, evaluamos primero la distribución de pérdidas durante la gestación analizando las tasas de desarrollo a blastocisto tardío, implantación y nacimiento. Después comparamos el perfil transcriptómico de embriones de 6 días, previamente congelados y transferidos en el estadio de mórula, con embriones desarrollados in vivo (6 días post-inseminación). Para ello, llevamos a cabo un análisis microarray de dos colores y usamos una plataforma genérica específica de conejo. Las tasas de desarrollo a blastocisto tardío, implantación y nacimiento fueron más bajas para los embriones congelados. Así mismo, también se observaron diferencias a nivel de expresión, y los embriones viables de 6 días del grupo congelado presentaron 70 genes diferencialmente expresados. Esta fue la primera aproximación que nos proporcionó una lista de genes candidatos que podrían provocar fallos en el diálogo materno-embionario, implantación y formación de la placenta.

El capítulo II evaluó la distribución de pérdidas durante la gestación debidas al proceso de vitrificación. Sin embargo, en este caso, para evaluar los efectos de la vitrificación sobre la expresión génica de blastocistos tardíos usamos la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) con 10 genes candidatos, elegidos por estar diferencialmente expresado en los embriones congelados del anterior trabajo (*SCGB1A1*, *EMP1*, *C1QTNF1*, *ANXA3*, *EGFLAM* y *TNFAIP6*), o por su rol en el desarrollo embrionario e implantación (*OCT4*, *VEGF*, *HBA* and *LAMA 4*). Además, introdujimos también datos ecográficos sobre el tamaño del saco embrionario, feto, la placenta fetal y materna desde el día 10 hasta el 14 de gestación. Los resultados mostraron dos picos principales de pérdidas durante la gestación: Uno situado antes de la implantación y el otro después. Asimismo, también detectamos una reducción en el tamaño del feto y de la placenta materna entre los días 10 y 14. Finalmente, pudimos

observar que, comparado con los embriones de 6 días desarrollados en condiciones in vivo, la expresión relativa de los transcritos *SCGB1A1*, *EMP1*, *C1QTNF1*, *ANXA3*, *EGFLAM* y *TNFAIP6* estaba significativamente alterada en los embriones vitrificados, siguiendo además el patrón previamente observado en los embriones congelados.

En el capítulo III se compararon directamente los transcriptomas de los embriones de 6 días obtenidos de embriones congelados y vitrificados de 3 días. Siguiendo los mismos procedimientos que en los trabajos anteriores, evaluamos la distribución de pérdidas a lo largo de la gestación analizando las tasas de desarrollo a blastocisto tardío, implantación y nacimiento. Asimismo, empleando la misma plataforma genérica microarray del primer experimento realizamos un análisis dos colores microarray en el que comparamos directamente el perfil transcriptómico a día 6 de desarrollo de embriones congelados y vitrificados. Los resultados reportaron que la congelación y la vitrificación tienen los mismos efectos dañinos sobre el desarrollo a día 6, pero la distribución de pérdidas difiere durante la implantación y el desarrollo, siendo las tasas de implantación y nacimiento mayores para el grupo vitrificado. Las similitudes a día 6 de desarrollo también se reflejaron en el patrón de expresión génica, porque no se detectaron diferencias a nivel transcriptómico entre los dos tipos de embriones.

En el capítulo IV se analizó el transcriptoma de los embriones vitrificados de 6 días y placentas fetales de 14 días frente al transcriptoma de embriones y placentas control no vitrificados pero que fueron recuperados y transferidos, aislando así el efecto del proceso de vitrificación. Al igual que observamos en el capítulo II, los embriones vitrificados que eran capaces de llegar al estadio de blastocisto tardío eran también capaces de implantar, pero no todos los embriones implantados tenían la capacidad de finalizar la gestación. Teniendo en cuenta los resultados de las ecografías del trabajo anterior, tomamos datos del peso del feto, la placenta fetal y materna a día 14 de desarrollo y del peso al nacimiento. En los resultados detectamos un descenso en los pesos del feto y la placenta materna, así como un incremento en el peso al nacimiento de los embriones vitrificados. En este experimento, para la evaluación de la expresión génica introdujimos unas cuantas modificaciones en el diseño experimental. Así, empleamos una plataforma microarray específica para embrión de conejo y realizamos un análisis microarray de un color. En el caso de los embriones de 6 días no encontramos diferencias significativas en la expresión génica, pero en el caso de las placentas identificamos 60 genes sobreexpresados. Llegados a este punto, realizamos un análisis 2D-DIGE en las placentas fetales para encontrar diferencias a nivel proteómico. Así, detectamos 89 proteínas diferencialmente expresadas en las placentas de 14 días de desarrollo derivadas de embriones vitrificados.

Debido a los anteriores resultados de alteraciones a nivel transcriptómico y proteómico en las placentas pocos días después de la implantación, el capítulo V lo centramos en el

estudio de las alteraciones proteómicas en placentas fetales de 24 días de desarrollo. En este trabajo pretendimos comparar los perfiles proteicos de placentas fetales de embriones vitrificados y controles en la última parte de la gestación, pocos días antes del nacimiento. Tras realizar un análisis 2D-DIGE encontramos que había 32 proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos experimentales. Estos resultados demostraron que la vitrificación induce cambios sustanciales en la expresión de proteínas placentarias al final de la gestación, y que aparte de las consecuencias a corto plazo, la crioconservación embrionaria puede provocar consecuencias a largo plazo en esos fetos que al final nacen.

Los resultados de esta tesis nos permiten suponer que la crioconservación embrionaria, bien sea por congelación o vitrificación, no debe ser neutral. Además, por primera vez se han observado modificaciones en los embriones vitrificados ya implantados. Basándonos en estos resultados, nuestro trabajo deja abierta la cuestión de si los efectos causados por la vitrificación durante el desarrollo fetal pueden conllevar algún tipo de alteraciones metabólicas o fisiológicas en la vida adulta.