

RESUM

L'objectiu general d'aquesta tesi va ser l'optimització de les actuals metodologies de crioconservació ovocitaria per a obtenir descendència viva a partir d'òvuls crioconservats de conilla.

En el capítol 1 es va avaluar la configuració del fus meiótic, la distribució dels grànuls corticals (GCs) i la capacitat de desenvolupament dels ovòcits després de la seua crioconservació amb els procediments actuals de congelació i vitrificació. L'organització del fus meiótic va ser alterada dràsticament independentment del mètode utilitzat. No obstant això, l'alteració de la distribució dels GCs va ser més evident en els ovòcits vitrificats que en els congelats i la tasa de desenvolupament fins l'estadi de blastocist després de l'activació partenogenota només es va obtenir utilitzant el mètode de congelació. D'aquest capítol pot concloure's que ambdós mètodes afecten per igual l'estructura de l'ovòcit però el mètode de congelació pareix l'opció més recomenable en el conill com a conseqüència de la sensibilitat que presenta aquesta espècie a les altes concentracions de crioprotectors.

L'objectiu dels dos següents capítols va ser l'optimització dels procediments de crioconservació mitjançant l'ús de diferents estratègies per a modificar els ovòcits i fer-los així més crio-resistents.

En el capítol 2, es van emprar el Taxol i el Cytochalasin B per a estabilitzar el sistema del citoesquelet durant la vitrificació. L'efecte d'aquestes dues molècules sobre la configuració del fus meiótic i els cromosomes i el desenvolupament fins blastocisto després de l'activació partenogenota van ser també avaluats. No es van observar diferències en l'estructura entre els grups

vitrificats. Quant a la divisió i la capacitat de desenvolupament, no es van trobar diferències significatives entre el grup vitrificat no tractat i el grup d'ovòcits tractats amb Taxol, però cap dels ovòcits tractats amb Cytochalasin B va aconseguir-ho. Per tant, la configuració estructural i la capacitat de desenvolupament dels ovòcits vitrificats no van millorar després d'aquest tractament. Inclús el tractament amb Cytochalasin B va parèixer produir un efecte perjudicial en la capacitat de desenvolupament d'aquests ovòcits.

En el capítol 3, els ovòcits van ser tractats amb ciclodextrines carregades amb colesterol (CLC) per a incrementar la fluïdesa i l'estabilitat de la membrana i millorar així la capacitat de desenvolupament dels ovòcits crioconservats després de l'activació partenogèntica o la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozous (ICSI). La incorporació de colesterol i la seua permanència després de la crioconservació va ser avaluada utilitzant microscòpia confocal. Els resultats van mostrar que el colesterol era incorporat dins de l'ovòcit i que romanien encara que en menor quantitat després dels procediments de crioconservació. No obstant això, no es van obtenir millores en la capacitat de desenvolupament després de l'activació partenogènica o la ICSI.

En els últims tres capítols d'aquesta tesi, el principal objectiu va ser el desenvolupament d'una tècnica fiable que permetera obtenir descendència viva a partir d'aquests ovòcits crioconservats. Per a aquest objectiu, es va emprar la fecundació *in vivo* utilitzant la transferència intraoviductal d'ovòcits assistida per mitjà de laparoscòpia com una bona alternativa per a sobrepassar la deficiència de les tècniques de fertilització *in vitro* en l'espècie cunícola.

En el capítol 4, es van emprar dos models de femelles receptores (ovariectomitzades o l'oviducte de les quals va ser lligat immediatament després de la transferència) per a comparar l'habilitat dels ovòcits frescos de ser fertilitzats *in vivo*. Este primer treball va mostrar que en tots els grups transferits la taxa de recuperació embrionària va disminuir significativament, però en el grup de femelles receptores l'oviducte de les quals va ser lligat, es van obtindre millors resultats comparats amb les femelles ovariectomitzades. Per aquesta raó, el model de receptores amb els oviductes lligats després de la transferència van ser emprades per a obtindre descendència a partir d'òvuls congelats. Els resultats obtinguts en aquest capítol van suggerir que era possible obtindre descendència a partir d'aquestos òvuls. No obstant això, aquestos tipus de models animals comprometien l'ús del tracte reproductiu en un percentatge elevat de femelles.

Per aquesta raó, el capítol 5 es va centrar en el desenvolupament d'un altre tipus de model animal com a alternativa als dos anteriors. Primer, es va avaluar l'habilitat de l'adhesiu tisular de cianoacrilato per a bloquejar l'oviducte abans de l'ovulació. A continuació, es va avaluar la capacitat de fertilització *in vivo* d'ovòcits frescos després de tancar l'oviducte una vegada realitzada la transferència intraoviductal dels mateixos. Finalment, es van transferir ovòcits congelats per a avaluar la taxa de naixements. Els resultats van mostrar que aquest adhesiu era efectiu a l'hora de bloquejar l'oviducte, ja que no es va recuperar cap embrió dels oviductes bloquejats sis dies després de la inseminació artificial (IA). A més, aquest mètode permetia la fertilització tant d'òvuls frescos com de congelats, obtenint una taxa de naixements major que l'obtinguda amb els models de receptores anteriors. Aquest estudi va suggerir

que l'ambient *in vivo* podria ajudar a millorar els resultats de la crioconservació ovocitària.

Per això, aquest va ser el mètode emprat en l'últim capítol d'aquesta tesi per a generar, per primera vegada, descendència viva a partir d'ovòcits vitrificats de conilla. Els resultats obtinguts revelaren que no hi havia diferències en la taxa de naixements entre els òvuls transferits vitrificats i congelats. No obstant això, basant-nos en els resultats obtinguts amb ovòcits frescos, encara es necessiten més experiments si es vol millorar l'eficiència de la tècnica.