

RESUMEN

El objetivo general de esta tesis fue la optimización de las actuales metodologías de crioconservación ovocitaria para obtener descendencia viva a partir de óvulos crioconservados de coneja.

En el capítulo 1 se evaluó la configuración del huso meiótico, la distribución de los gránulos corticales (GCs) y la capacidad de desarrollo de los ovocitos tras su crioconservación mediante los procedimientos actuales de congelación y vitrificación. La organización del huso meiótico fue alterada drásticamente independientemente del método utilizado. Sin embargo, la alteración de la distribución de los GCs fue más evidente en el caso de los ovocitos vitrificados y la tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocito tras la activación partenogenota solamente se obtuvo utilizando el método de congelación. De este capítulo se puede concluir que ambas metodologías afectan por igual la estructura del ovocito. Sin embargo, el método de congelación parece ser la opción más recomendable en el conejo como consecuencia de la sensibilidad que presenta esta especie a las altas concentraciones de crioprotectores.

El objetivo de los dos siguientes capítulos fue la optimización de los procedimientos de crioconservación mediante el uso de diferentes estrategias para modificar a los ovocitos y hacerlos así más crioresistentes.

En el capítulo 2, se emplearon el Taxol y el Cytochalasin B para estabilizar el sistema del citoesqueleto durante la vitrificación. El efecto de estas dos moléculas sobre la configuración del huso meiótico y los cromosomas y el desarrollo hasta blastocisto tras la activación partenogenota fueron también

evaluados. No se observaron diferencias en la estructura entre los diferentes grupos de ovocitos vitrificados. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la división y la tasa de desarrollo hasta blastocisto entre el grupo vitrificado-no tratado y el grupo de ovocitos tratados con Taxol, pero ninguno de los ovocitos tratados con Cytochalasin B alcanzó dicho estadio. Por tanto, la configuración estructural y la capacidad de desarrollo no mejoraron tras este tratamiento. Incluso el tratamiento con Cytochlasin B pareció generar un efecto perjudicial sobre el desarrollo de estos ovocitos.

En el capítulo 3, los ovocitos fueron incubados con ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) para incrementar la fluidez y la estabilidad de la membrana y mejorar así su capacidad de desarrollo tras el procedimiento de crioconservación y la activación partenogenota o la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). La incorporación de colesterol en el ovocito y su permanencia tras la crioconservación fue evaluada utilizando microscopía confocal. Los resultados mostraron que el colesterol era incorporado dentro del ovocito y que permanecía, aunque en menor cantidad, tras los procedimientos de crioconservación. Sin embargo, no se obtuvieron mejoras en la capacidad de desarrollo de los mismos tras la activación partenogenota o la ICSI.

En los últimos tres capítulos de esta tesis, el principal objetivo fue el desarrollo de una técnica fiable que permitiera obtener descendencia viva a partir de estos ovocitos crioconservados. Para este objetivo, se empleó la fecundación *in vivo* utilizando la transferencia intraoviductal de ovocitos asistida mediante laparoscopia como una buena alternativa para sobrepasar la deficiencia de las técnicas de fertilización *in vitro* en la especie cunícola.

En el capítulo 4, se emplearon dos modelos de hembras receptoras (ovariectomizadas o cuyo oviducto fue ligado inmediatamente tras la transferencia) para comparar la habilidad de los ovocitos frescos transferidos de ser fertilizados *in vivo*. Este primer trabajo mostró que en todos los grupos transferidos, la tasa de recuperación embrionaria disminuyó significativamente. Sin embargo, en el grupo de hembras receptoras cuyo oviducto fue ligado, se obtuvieron mejores resultados que en las hembras ovariectomizadas. Por esta razón, el modelo de hembras receptoras cuyos oviductos fueron ligados tras la transferencia fue el de elección para obtener descendencia viva a partir de óvulos congelados. Los resultados obtenidos en este capítulo sugirieron que era posible obtener descendencia a partir de óvulos crioconservados, pero estos dos tipos de modelo animal comprometían el uso del tracto reproductivo en un porcentaje elevado de hembras.

Por esta razón, el capítulo 5 de la tesis se centró en el desarrollo de otro tipo de modelo animal como alternativa a los dos anteriores. Primero, se evaluó la habilidad del adhesivo tisular de cianoacrilato para bloquear el oviducto antes de la ovulación. A continuación, se evaluó la capacidad de fertilización *in vivo* de ovocitos frescos tras cerrar el oviducto una vez realizada la transferencia intraoviductal de los mismos. Finalmente, se transfirieron ovocitos congelados para evaluar la tasa de nacimientos. Los resultados mostraron que este adhesivo era efectivo a la hora de bloquear el oviducto, ya que no se recuperó ningún embrión de los oviductos bloqueados seis días después de la inseminación artificial (IA). Además, este método permitía la fertilización tanto de óvulos frescos como congelados, obteniendo una tasa de nacimientos mayor que la obtenida con los dos modelos de receptoras anteriores. Estos

resultados sugirieron que el ambiente *in vivo* podría ayudar a mejorar los resultados de la crioconservación ovocitaria.

Por ello, este fue el método empleado en el último capítulo de esta tesis para generar por primera vez, descendencia viva a partir de ovocitos vitrificados de coneja. Los resultados obtenidos revelaron que no existen diferencias en la tasa de nacimientos entre los óvulos transferidos vitrificados y los congelados. Sin embargo, basado en los resultados obtenidos con ovocitos frescos, todavía se necesitan más experimentos si se quiere mejorar la eficiencia de la técnica.