

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



EFECTO DE LA VITRIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES SOBRE SU DESARROLLO FETAL Y PREPUBERAL

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: MARTA DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ

TUTOR: JOSÉ SALVADOR VICENTE ANTÓN

Curso Académico: 15/16

VALENCIA, JULIO de 2016



Título TFG: Efecto de la vitrificación de los embriones sobre su desarrollo fetal y prepuberal.

Alumna: Dña. Marta Domínguez Martínez.

Tutor Académico: Prof. D. José Salvador Vicente Antón.

Valencia, Julio 2016.

Resumen: Los embriones preimplantacionales de mamífero son sensibles a las condiciones ambientales en las que se desarrollan, a pesar de ello, son capaces de adaptarse a las alteraciones del ambiente mediante cambios epigenéticos. La crioconservación de óvulos y embriones es considerada una herramienta importante no solo en la reproducción humana asistida, sino también para preservar la biodiversidad animal. No obstante la neutralidad de esta técnica ha sido cuestionada durante los últimos años, por lo que se han iniciado estudios acerca de las repercusiones que podría tener a medio y largo plazo sobre los individuos.

Por ello el objetivo de este trabajo fue evaluar si la vitrificación de embriones induce alteraciones en el desarrollo prenatal y prepuberal en el conejo, tanto en su crecimiento como a nivel hepático. Así se evaluó el desarrollo prenatal mediante ultrasonografía en individuos procedentes de embriones vitrificados, frescos y controles. Se realizó un seguimiento del crecimiento durante las 9 primeras semanas de vida, tras lo que se sacrificó un grupo de conejos macho y se registró el peso de los órganos de la cavidad torácica y abdominal. Además se estudió la expresión diferencial de genes (APOA4, ELOVL4, LIPC, CLN6, IGF-I, CYP7A1) y metabolitos (ácidos biliares, bilirrubina total, colesterol, albúmina y glucosa) relacionados con el metabolismo lipídico, el metabolismo del colesterol, y sobre crecimiento.

Se encontraron diferencias respecto al desarrollo prenatal, el cual comienza tras la implantación, con retraso por parte de los animales procedentes de embriones vitrificados y frescos, pero que es compensado al inicio de la última semana de gestación. Por otro lado, no fueron encontradas diferencias estadísticas ni en la expresión genética ni en los metabolitos relacionados con la función hepática, aunque en algunos de ellos (APOA4, LIPC, CLN6, glucosa y colesterol) será necesaria la ampliación del número de muestras y su re-análisis. Por el contrario sí que se encontraron diferencias significativas respecto a las concentraciones de IGF-I y en los pesos de hígado, glándulas suprarrenales y pulmones, así como en los pesos de los animales al sacrificio.

Por tanto se concluye que la vitrificación podría no ser neutral, induciendo cambios en el desarrollo de los individuos, aunque es necesario aumentar el número muestral para determinar la relevancia de estos efectos.

Palabras clave: vitrificación, desarrollo fetal y prepuberal, epigenética, hígado, conejo

Abstract: Preimplantation mammalian embryos are sensitive to environmental conditions where they develop. However, they are able to adapt to changes in the environment through mechanisms which include epigenetic modifications. Oocytes and embryos cryopreservation is considered an important tool not only in assisted human reproduction, but also as a tool in the preservation of animal biodiversity. Nevertheless the neutrality of this technique has been questioned in the last years and as a result, studies have been initiated in order to evaluate the medium and long term effects of this technique on individuals.

Then the aim of this study was thus, to evaluate whether early embryos vitrification induces alterations on prenatal and prepubertal development in rabbits, in both growth and hepatic function. Prenatal development was evaluated by ultrasonography of individuals from vitrified embryos, fresh and controls. Growth monitoring was performed during the first 9 weeks of life, after male rabbits were slaughtered, recording the weight of the organs of the chest and abdominal cavity. Furthermore, the differential expression of genes (APOA4, ELOVL4, LIPC, CLN6, IGF-I, CYP7A1) and metabolites (bile acids, total bilirubin, cholesterol, albumin and glucose) related to lipid metabolism, cholesterol metabolism and growth was studied.

Differences were found in the prenatal development, which begins after implantation found, with a delay in animals from vitrified and fresh embryos, but this was compensated at the beginning of the last week of gestation. On the other hand no statistical differences were found in either gene expression or metabolites related to liver function, although in some of them (APOA4, LIPC, CLN6, glucose and cholesterol) the sample size needs to be increased and reanalysed. In contrast, significant differences were found in the concentrations of IGF-I and weights of liver, adrenal glands and lungs, as well as the weights of the animals at slaughter.

Therefore it concludes that vitrification may not be neutral, inducing changes in the development of individuals, although it is necessary to increase the sample size to determine the relevance of these effects.

Key words: vitrification, fetal and prepubertal development, epigenetic, liver, rabbit.

Resum: Els embrions preimplantacionals de mamífer són sensibles a les condicions ambientals on es desenvolupen, malgrat això, són capaços d'adaptar-se a les alteracions de l'ambient mitjançant canvis epigenètics. La crioconservació d'òvuls i embrions és considerada una eina important no solament en la reproducció humana assistida, sinó també per preservar la biodiversitat animal. No obstant la neutralitat d'aquesta tècnica ha estat qüestionada durant els últims anys, per la qual cosa s'han iniciat estudis sobre les repercussions que podria tenir a mitjà i llarg termini en els individus.

Per això l'objectiu d'aquest treball va ser avaluar si la vitrificació d'embrions indueix alteracions en el desenvolupament prenatal i prepuberal en el conill, tant en el seu creixement com a nivell hepàtic. Per això es va avaluar el desenvolupament prenatal mitjançant ultrasonografia en individus procedents d'embrions vitrificats, frescs i controls. Es va realitzar un seguiment del creixement durant les 9 primeres setmanes de vida, després un grup de mascles va ser sacrificat, registrant el pes dels òrgans de la cavitat toràcica i abdominal. A més, es va estudiar l'expressió diferencial de gens (APOA4, ELOVL4, LIPC, CLN6, IGF-I i CYP7A1) i metabòlits (àcids biliars, bilirubina total, colesterol, albúmina i glucosa) relacionats amb el metabolisme lipídic, el metabolisme del colesterol i sobre creixement.

Es van trobar diferències respecte al desenvolupament prenatal, el qual comença després de la implantació, amb retard per part dels animals procedents d'embrions vitrificats i frescs, però que és compensat a l'inici de l'última setmana de gestació. D'altra banda, no van ser trobades diferències estadístiques ni en l'expressió genètica ni en els metabòlits relacionats amb la funció hepàtica, encara que en alguns d'ells (APOA4, LIPC, CLN6, glucosa i colesterol) serà necessària l'ampliació del nombre de mostres i el seu re-anàlisi. Per contra, sí que es van trobar diferències significatives respecte a les concentracions de IGF-I i en els pesos de fetge, glàndules suprarenals i pulmons, així com en els pesos dels animals al moment de sacrifici.

Per tant es conclou que la vitrificació podria no ser neutral, induint canvis en el desenvolupament dels individus, encara que és necessari augmentar el nombre mostral per determinar la rellevància d'aquests efectes.

Paraules claus: vitrificació, desenvolupament fetal y prepuberal, epigenètic, fetge, conill.

AGRADECIMIENTOS:

Las mejores cosas que se pueden decir en esta vida son 'te quiero', 'lo siento' y 'gracias', bueno quizás podría añadir 'una cerveza por favor', pero eso depende de la situación. Llegados a este punto es hora de recalcar las 3 primeras y en especial quiero dar las gracias.

Gracias a ti Jose, por darme esta oportunidad y por confiar en mí, gracias por todos tus momentos y por tu infinita paciencia, pero en especial gracias por la pasión que le pones a la enseñanza.

Gracias también a Paco y a David, al primero por sus otros muchos momentos y consejos, y al segundo por no dejarse un solo detalle sin explicarme y hacerlo siempre con la mejor de sus sonrisas. Y no puedo olvidarme del resto del personal del laboratorio, por hacer que tomar un café a media mañana siempre sea más ameno.

Hay una canción de los Beatles que dice: *'I'm gonna try with a little help from my friends'*, y la verdad que no se equivocan, jamás podría haberlo intentado sin vosotros, y siento no decirlo nunca lo afortunada que soy de teneros a todos y cada uno de vosotros. A la familia biotecnóloga como nosotros nos llamamos, esa familia que ahora está separada en unos 6 países diferentes y hasta con océanos de por medio pero que incluso así siguen estando a tu lado y haciendo que el término distancia solo sea algo que signifique una casa gratis para unas vacaciones baratas. A Isa, Marta y Berta, gracias a vosotras, porque cada una a vuestra manera siempre sabéis que decir en el momento adecuado y aunque somos tan distintas como el día y la noche no sería lo que soy sin vosotras. A Lu, esa chica que conocí un día por casualidad en un país diferente, con un idioma del que no tenía ni idea, y tres meses después me despedí de una hermana. Pero incluso a día de hoy lo que Berlín unió no lo ha separado nuestras vidas, siempre estás ahí con tu fantástico acento gallego, formaste parte de la gran aventura de mi vida y no podría haber pedido una compañera de aventuras mejor. Y por último a Mica, Su e Iván, por vuestra compañía este año, por los cafés y las sesiones de biblioteca. Gracias a todos.

Y por último gracias a mi familia, en especial a mi madre y a mi abuelo. Gracias, porque sé que todo lo que hacéis lo hacéis por mí, porque me habéis ayudado a llegar hasta aquí. Lo siento, porque sé que el camino no siempre ha sido fácil y habéis sufrido más de lo que me hubiera gustado. Pero gracias mamá por enseñarme que aunque no juegue en casa, vaya perdiendo el partido y me caiga tengo que levantarme una vez más o las que hagan falta, para que nadie salvo yo me diga hasta donde puedo llegar. No os puedo prometer que las cosas vayan a ser más fáciles a partir de ahora, pero quiero que sepáis que gran parte del mérito de esto es vuestro.

Así que os quiero, lo siento, gracias y una cerveza por favor.

ÍNDICE GENERAL:

1	Introducción	1
1.1	El conejo como modelo animal en reproducción	1
1.2	Desarrollo embrionario y fetal en el conejo.....	1
1.3	Reprogramación embrionaria	4
1.3.1	Efecto de la crioconservación sobre la reprogramación embrionaria	6
2	Objetivo	8
3	Material y métodos	9
3.1	Animales.....	9
3.2	Recuperación, vitrificación y transferencia de embriones.....	9
3.3	Obtención del grupo control.....	10
3.4	Seguimiento mediante ultrasonografía	10
3.5	Crecimiento durante las 9 primeras semanas de vida	11
3.6	Disección de los animales.....	11
3.7	Obtención de las muestras de hígado y sanguíneas	11
3.8	Extracción de RNA y qPCR	13
3.9	Análisis de metabolitos de función hepática	13
3.10	Niveles séricos de IGF-I	15
3.11	Análisis estadístico	15
3.12	Diseño experimental	16
4	Resultados	17
4.1	Desarrollo prenatal	17
4.2	Evaluación del desarrollo al nacimiento, destete y sacrificio.	19
4.3	Disecciones de los conejos con 9 semanas	19
4.4	Evaluación de la expresión genética tras la transferencia y vitrificación.....	20
4.5	Resultados de los metabolitos de la función hepática.....	20
5	Discusión	22
6	Conclusiones	26
7	Bibliografía	27

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Cronología de la división de un embrión de conejo después de la fecundación. A. Estado pronuclear. B. Embrión de 2 células. C. Embrión de 4 células D. Embrión de 8 células. Fotografías tomadas a x100 μm (Sultana *et al.*, 2009).

Figura 2. Blastocisto de 4 días donde se puede apreciar la zona pelúcida (ZP), la capa de mucina (CM) el embrioblastema (EM) y el trofoblasto (TF). Fotografía x10 μm (Saéñz de Juano, 2010).

Figura 3. Desarrollo embrionario desde el estadio de blastocisto hasta la aparición de los primeros somitas (adaptada de Fischer *et al.*, 2012).

Figura 4. Estructuras feto-placentarias en día 14 de gestación (Sáenz-De-Juano, 2014).

Figura 5. Representación esquemática de las interacciones potenciales entre el ambiente del embrión, ya sea in vivo o in vitro, y las potenciales consecuencias sobre el embrión tanto a corto como a largo plazo. Diferentes estados y linajes del embrión se muestran diferentes colores: las células indiferenciadas (rosa), trofoectodermo (amarillo), ICM (azul claro) y el endodermo primitivo (azul oscuro) (adaptada de Fleming *et al.*, 2004).

Figura 6. Línea amarilla de conejo neozelandés del ICTA.

Figura 7. Medidas mediante ultrasonografía del feto (A) y placentas (B) (Sáenz de Juano, 2014).

Figura 8. Hígado de conejo.

Figura 9. Reacción enzimática para la determinación de ácidos biliares (protocolo Spinreact para la determinación de ácidos biliares totales).

Figura 10. Reacción enzimática y colorimétrica para la determinación de colesterol (protocolo de Spinreact para la determinación de colesterol).

Figura 11. Reacción enzimática para la determinación de la glucosa (protocolo de Spinreact para la determinación de la glucosa).

Figura 12. Realización del ensayo ELISA, lavador automático de placas (A), detención de la reacción enzimática (B).

Figura 13. Diseño experimental.

Figura 14. Evolución del área del Saco Fetal (FS) durante la gestación. Valores para cada día con letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Figura 15. Evolución del área de la Placenta Fetal (FP) durante la gestación. Valores para cada día con letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Figura 16. Evolución del área de la Placenta Materna (MP) durante la gestación. Valores para cada día con letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Figura 17. Evolución de la Longitud del Feto CRL durante la gestación. Valores para cada día con letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Figura 18. Expresión génica de los genes seleccionados.

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real, secuencia, el código de acceso de los mismos y tamaño del fragmento amplificado para los genes histona (H2AFZ), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), apolipoproteína A (APOA4), elongasa de ácidos grasos 4 (ELOVL4), lipasa hepática (LIPC), lipofuscinosis ceroides neuronal 6 (CLN6), factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) y el polipéptido 1 de la subfamilia A de la familia 7 del citocromo P450 (CYP7A1).

Tabla 2. Resultados de los pesos tomados al nacimiento, destete y a los 63 días.

Tabla 3. Resultados de las disecciones de conejos de 9 semanas de vida.

Tabla 4. Concentraciones de metabolitos e IGF-I.

ABREVIATURAS:

3- α HSD: 3- α hidroxisteroide dehidrogenasa.

4-AF: Fenol 4-aminofenazona.

ANOVA: Análisis de la varianza.

APOA4: Apolipoproteína A.

ARN: Ácido ribonucleico.

BOE: Boletín Oficial del Estado.

BSA: Albúmina de Suero Bovino.

cdNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

CHE: Enzima colesterol esterasa.

CHOD: Enzima colesterol oxidasa.

CLN6: Lipofuscinosis ceroide neuronal.

CM: Cubierta de mucina.

CRL: Longitud cráneo-caudal.

CYP7A1: Polipéptido 1 de la subfamilia A de la familia 7 del citocromo P450.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfatos.

DPBS: Tampón fosfato salino Dulbecco.

EG: Etilenglicol.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

ELOVL4: Elongasa de ácidos grasos 4.

EM: Embrioblastema.

FP: Placenta Fetal

FS: Saco Fetal.

GADPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GOD: Glucosa oxidasa.

H2AFZ: Miembro Z de la familia de las histonas H2A.

HCV: Hospital Clínico Veterinario.

HPA: Hipotálamo-pituitaria-adenocortical.

ICM: Masa celular interna.

ICTA: Instituto de Ciencia y Tecnología Animal.

IGF: Factor de crecimiento insulínico.

LIPC: Lipasa hepática.

MP: Placenta materna.

p/v: peso/volumen.

POD: Enzima peroxidasa.

RT qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real.

TE: Trofoectodermo.

TF: Trofoblasto.

TFG-β: Factor de crecimiento transformante beta.

UPV: Universitat Politècnica de València.

v/v: volumen/volumen.

ZP: Zona pelúcida.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. EL CONEJO COMO MODELO ANIMAL EN REPRODUCCIÓN.

El conejo constituye el tercer animal más utilizado en investigación científica en la Unión Europea, superado únicamente por el ratón y la rata (EU Report 2010). El conejo, habitualmente biorreactor para la producción de anticuerpos policlonales, es además un modelo animal para estudios de biología del desarrollo embrionario, ortopedia, oftalmología, enfermedades cardiovasculares y metabólicas, toxicidad de fármacos y últimamente, es una de las especies en las que se ensayan los procedimientos de edición génica (Yan *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2016). Esto se debe a las ventajas que presenta esta especie filogenéticamente más próxima al ser humano que los ratones, y un tamaño, peso, crecimiento y reproducción que facilitan el manejo con un bajo coste de mantenimiento.

Históricamente el conejo ha sido una de las especies modelo utilizadas para los estudios de biología del desarrollo debido a su fisiología reproductiva (Fischer *et al.*, 2012). El conejo no presenta un anoestro estacional, tiene un ciclo reproductivo corto (situado alrededor de 30 días), y se trata de una especie en la cual la ovulación esta inducida por el macho durante el coito, lo cual facilita el seguimiento del desarrollo embrionario durante su segmentación, gastrulación e implantación que hasta el noveno día presenta fases y estructuras similares a las del embrión humano (Hohn *et al.*, 1992). Respecto a la morfología del aparato reproductor, las hembras presentan dos úteros de doble cérvix, es decir, un par de úteros y cérvix separados y completamente funcionales, lo cual permite la realización de estudios embrionarios sobre el mismo animal bajo ambientes uterinos diferentes (Fischer *et al.*, 2012). Además, en las últimas décadas se han puesto apunto en esta especie técnicas reproductivas que permiten obtener, conservar, madurar o desarrollar e incluso modificar gametos y embriones con relativa facilidad.

1.2. DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL EN EL CONEJO.

El conejo se trata de una especie de ovulación inducida como ya se ha descrito con anterioridad, este proceso ocurre tras la monta, pasado un período de 10 horas aproximadamente ocurre la fecundación. Posterior a la fecundación el cigoto sufre una serie de divisiones celulares que darán lugar al embrión. Entre las 2 y 4 horas posteriores a la ovulación aparece el segundo corpúsculo polar (Harper, 1961) y a partir de este punto se producen las siguientes segmentaciones en intervalos entre 8 y 9 horas para dar lugar a los estadios de 2, 4, 8 y 16 células (Carney y Foote, 1991).



Figura 1. Cronología de la división de un embrión de conejo después de la fecundación. **A.** Estado pronuclear. **B.** Embrión de 2 células. **C.** Embrión de 4 células **D.** Embrión de 8 células. Fotografías tomadas a $\times 100 \mu\text{m}$ (Sultana *et al.*, 2009).

En el estadio de 8 células se produce la activación del genoma embrionario que se completa en el estadio de 16 células, a la que sigue una serie de divisiones dentro del proceso

de segmentación antes de producirse la transición de mórula a blastocisto al igual que ocurre en muchos mamíferos incluidos los humanos (Telford *et al.*, 1990).

Así 68 horas tras el coito se produce la compactación de la mórula y en torno a las 72 horas se inicia la transición de mórula a blastocisto que será el inicio de la diferenciación de las diferentes líneas celulares embrionarias (Fischer *et al.*, 2012; Lavara *et al.*, 2014). Los procesos epigenéticos que tienen lugar en estas etapas son altamente dinámicos, y cualquier evento que tenga lugar en ellas podría alterar procesos posteriores en el desarrollo.

Dos líneas celulares forman la estructura del blastocisto: la masa celular interna (ICM), la cual conserva la pluripotencialidad para generar cualquier tejido del embrión, y las células del trofoectodermo (TE) las cuales perderán su pluripotencialidad y permitirán la implantación por medio de la placenta al contactar con el endometrio (Sáenz De Juano, 2010). Un gran número de factores regulan este proceso destacando entre ellos el gen POU5F1 el cual codifica para el factor de transcripción OCT4 y el gen NANOG. El OCT4 se expresa en estadios más tempranos y tiene un papel fundamental en el mantenimiento del estado pluripotente en el desarrollo preimplantacional, y está relacionado con procesos de diferenciación celular en distintas especies (Nichols *et al.*, 1998; Hansis *et al.*, 2001; Dode *et al.*, 2006). Tras esta diferenciación, el blastocisto se expande hasta que en el día 6 de la gestación se inicia el proceso de gastrulación. En este periodo el embrión de conejo a diferencia de otras especies remodela sus envueltas (zona pelúcida y cubierta de mucina)(Figura 2) para inicialmente generar una neozona y, posteriormente tras completar su expansión quedar envuelto por el gliolema. La remodelación de sus cubiertas será fundamental en el proceso de adhesión al endometrio y posterior implantación.



Figura 2. Blastocisto de 4 días donde se puede apreciar la zona pelúcida (ZP), la cubierta de mucina (CM) el embrioblastema (EM) y el trofoblasto (TF). Fotografía $\times 10\mu\text{m}$ (Saénz de Juano, 2010).

En la gastrulación se definirán la formación de los ejes corporales y la generación de las capas germinales definitivas: mesodermo, ectodermo y endodermo. El inicio de la gastrulación tiene lugar en el sexto día tras la monta, y se caracteriza por la presencia de una zona densa en la parte anterior del disco embrionario, tras 6 horas se produce una reducción de esta capa y un alargamiento del polo posterior que finalizará unas 24 horas después definiendo el nodo de Hense, la formación de somitas y el inicio de la neurulación (Figura 3)(Fischer *et al.*, 2012). En esta etapa el gen SOX2 tiene un papel destacado debido a que contribuye tanto en el

mantenimiento de la pluripotencialidad como en la diferenciación de los linajes, ya que su expresión no está restringida a uno de los dos procesos (Boyer *et al.*, 2006).

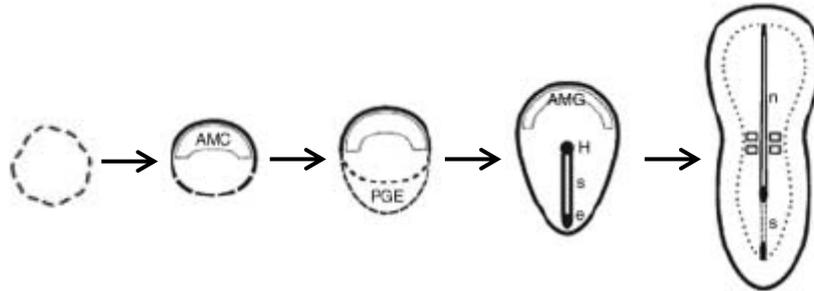


Figura 3. Desarrollo embrionario desde el estadio de blastocisto hasta la aparición de los primeros somitas (adaptada de Fischer *et al.*, 2012).

Pasados 8 días tras el coito, las células del trofoblastema forman unas proyecciones que se adhieren y fusionan con las superficie epitelial apical (Fischer *et al.*, 2012). En la adhesión, implantación y posterior desarrollo de la placenta es esencial una correcta comunicación entre la madre y el embrión mediante la placenta. Esto es posible gracias a que se producen unas secreciones embrionarias y endometriales, entre las que se destacan una gran variedad de factores de crecimiento (ej. EGF, TFG- β), moléculas de adhesión (ej. integrinas, osteopontina) y citoquinas (ej. interferones) que evitan la respuesta inmunológica de la madre (reconocimiento), y, el remodelado del epitelio uterino para poder facilitar la migración, adhesión y el proceso de placentación (Paria y Dey, 1990; Tamada *et al.*, 1999; Apparao *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2006).

Además los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II) han sido clasificados como parte fundamental en la regulación de la placentación, cuyo papel es clave en la regulación del transporte de aminoácidos y glucosa a la placenta teniendo un papel fundamental en la regulación del crecimiento fetal y placentario (Ashton y Spencer, 1983; Kniss *et al.*, 1994).

La placenta del conejo presenta una morfología discoidal, y su estructura es similar a la humana en especial en el último trimestre de la gestación. Los cambios hemodinámicos que ocurren durante la gestación en el conejo también son similares a los que ocurren en seres humanos, y al igual que en los primates el crecimiento placentario es más rápido en la primera mitad de la gestación, mientras que la ganancia de peso en el feto ocurre en la segunda mitad, debido al incremento de los intercambios entre el feto y la madre, gracias al aumento en la superficie placentaria (McArdle *et al.*, 2009). El proceso de placentación finaliza aproximadamente en el día 12 de la gestación (Adams, 1959)(Figura 4).



Figura 4. Estructuras feto-placentarias en día 14 de gestación (Sáenz De Juano, 2014).

1.3. REPROGRAMACIÓN EMBRIONARIA.

Los embriones preimplantacionales de mamífero son sensibles al ambiente en el cual se desarrollan, ya sea *in vivo* o *in vitro*, estas condiciones pueden ser tan dispares como las condiciones de cultivo en un laboratorio, la dieta materna, y consecuentemente por el ambiente uterino de la madre (Figura 5). Pero a su vez estos tienen la capacidad de adaptarse mediante mecanismos que podrían implicar *a posteriori* modificaciones en el desarrollo fetal y postnatal (Fleming *et al.*, 2004; Hocher, 2014). Esto se debe a que los embriones durante su desarrollo ya sea *in vivo* o *in vitro* modifican niveles de moléculas como aminoácidos o reguladores metabólicos, que desencadenan tanto modificaciones a corto como a largo plazo.

A corto plazo las células pueden sufrir cambios en la expresión génica, estrés metabólico, apoptosis o trastornos en la proliferación celular. A largo plazo, se ha demostrado una reducción en la capacidad de implantación, desajustes entre el feto y la placenta, alteración en el suministro materno de nutrientes así como la aparición de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en el individuo adulto (Sáenz de Juano, 2014).

La nutrición recibida en el ambiente intrauterino modula la función de números tejidos con actividad metabólica en el período postnatal y está demostrado que la malnutrición materna puede tener graves efectos en las funciones fisiológicas de la descendencia. Restricciones calóricas y nutricionales en la dieta materna puede incrementar los niveles de leptina placentaria la cual es esencial para la adecuada placentación y el desarrollo fetal, y este incremento en la leptina está asociado con la obesidad y el síndrome metabólico en edades adultas (Ramírez, 2012). Una malnutrición proteica durante el embarazo reduce el número de nefronas en los riñones causando hipertensión en la edad adulta. La malnutrición también está asociada a la disminución del peso y de la altura en la descendencia al nacimiento así como la susceptibilidad de padecer enfermedades crónicas en la etapa adulta como enfermedades cerebrovasculares o hipertensión arterial entre otras (Barker *et al.*, 1993; Wendy *et al.*, 1999; Ramírez, 2012).

Otros factores a considerar son la exposición a determinadas sustancias como el alcohol, la cafeína o el humo del tabaco, que están relacionadas con la desregulación del eje hipotálamo-pituitaria-adenocortical (HPA) de la descendencia, lo que conlleva a alteraciones epigenéticas cuya consecuencia recae en problemas en el sistema neuroendocrino y aumentan la susceptibilidad de padecer el síndrome metabólico en la edad adulta (Wang *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2013; Stroud *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015). Y estos factores tienen un impacto

remarcado en aquellos tejidos de rápida proliferación en los neonatos como puede ser el tejido hepático ya que se trata de la primera línea de desintoxicación y metabolización en el individuo y es especialmente sensible a las toxinas que contiene el humo del tabaco, ya que estas además presentan un elevada solubilidad en agua y un bajo peso molecular lo que permite su paso a través de la placenta al feto (Canales *et al.*, 2012; Zdravkovic *et al.*, 2005).

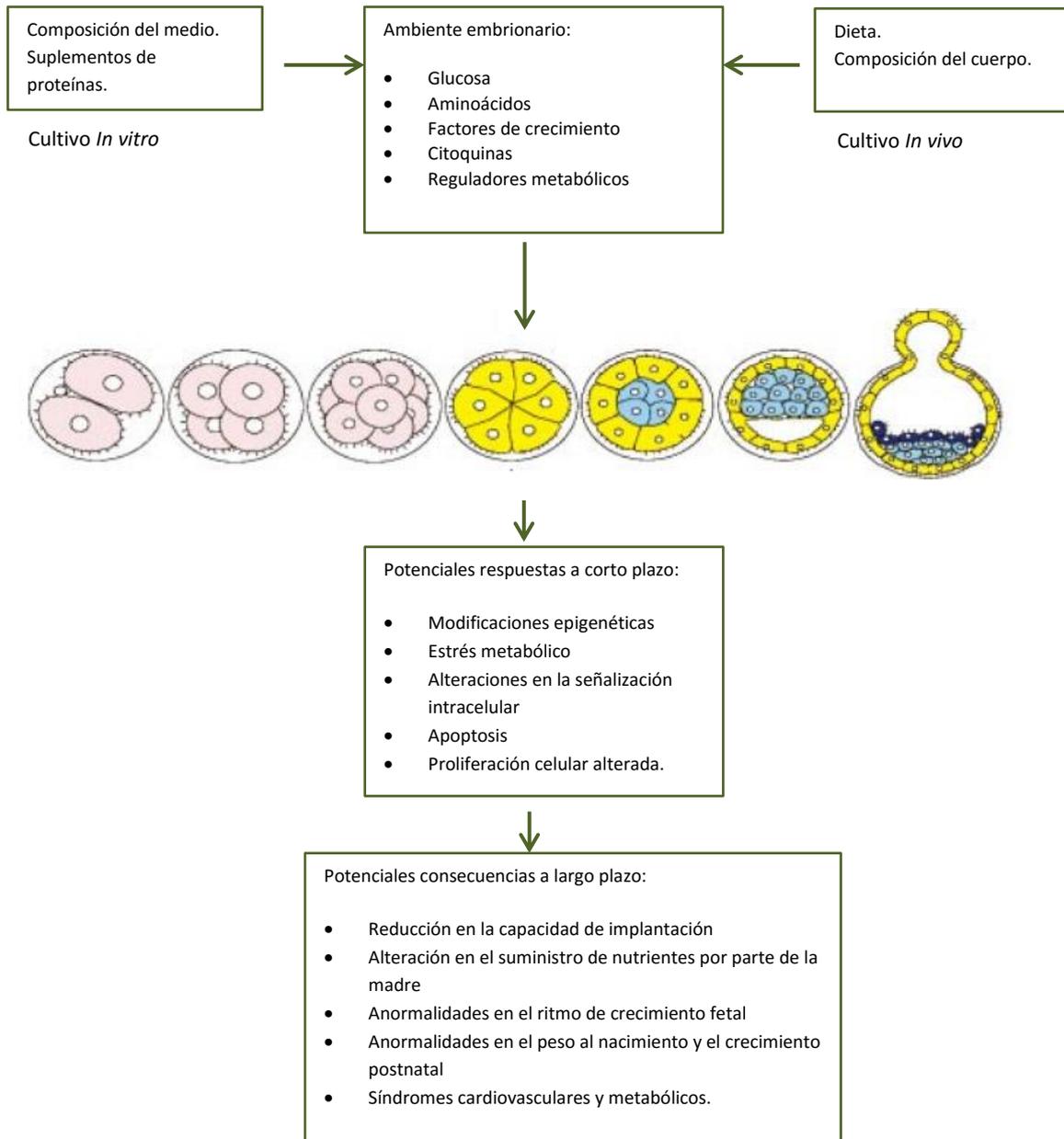


Figura 5. Representación esquemática de las interacciones potenciales entre el ambiente del embrión, ya sea *in vivo* o *in vitro*, y las potenciales consecuencias sobre el embrión tanto a corto como a largo plazo. Diferentes estados y linajes del embrión se muestran diferentes colores: las células indiferenciadas (rosa), trofoectodermo (amarillo), ICM (azul claro) y el endodermo primitivo (azul oscuro) (adaptada de Fleming *et al.*, 2004).

Todas estas observaciones han generado la hipótesis conocida como “enfermedad de origen fetal”, la cual sostiene que problemas en la descendencia adulta como hipertensión, enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tienen su origen en las adaptaciones que sufre el feto a los cambios mencionados con anterioridad (Hochoer, 2014).

Desde hace décadas diversos estudios tanto en embriones de modelos animales como humanos han demostrado que técnicas reproductivas tan comunes como el cultivo pueden inducir modificaciones que afectan tanto a su viabilidad como a su desarrollo prenatal y postnatal. La composición del medio, el nivel de glucosa o la suplementación con suero y/o el período de cultivo y el nivel de oxígeno son determinantes en la inducción de cambios en el desarrollo embrionario y fetal. Así por ejemplo, embriones de ratón que habían sido cultivados y posteriormente transferidos, presentaban un crecimiento fetal inferior a aquellos que no había sufrido ninguna manipulación (Bowman y McLaren, 1970). Además de estos ejemplos en roedores, se ha demostrado que embriones tempranos de oveja y vaca también presentan esta sensibilidad a las condiciones ambientales lo que da un desarrollo anormal fetal y placentario, aumento en la mortalidad postnatal, distocia, o una actividad pulmonar perinatal disfuncional (Walker *et al.*, 2000).

Actualmente, el número de niños nacidos gracias a las técnicas de reproducción asistida excede a los 4 millones (Pinborg *et al.*, 2013), pero al igual que en los embriones de los modelos animales estudiados, para el caso de los humanos también existen una gran diversidad de consecuencias fenotípicas asociadas a las condiciones de cultivo o a la manipulación de los embriones preimplantacionales como: una reducción del crecimiento fetal y bajo peso al nacimiento, partos prematuros y anomalías placentarias (Khosla *et al.*, 2001). Pero además, estos cambios ambientales se pueden traducir en alteraciones epigenéticas como la metilación del DNA, modificaciones de las histonas, o reemplazo de las variantes de histonas en el nucleosoma (Santos *et al.*, 2010). Durante los últimos años se han estudiado estas variaciones epigenéticas con varios síndromes de impronta genética como Beckwith-Wiedemann, Agelman, Prader-Willi o la diabetes neonatal transitoria (Amor y Halliday, 2008), pero a pesar de los avances logrados las limitaciones en estos estudios debido a las consideraciones éticas en el uso de embriones humanos para la investigación, o el hecho de que aquellos que son utilizados son los descartados para su transferencia, hace necesaria la ampliación de estas investigaciones para elucidar los mecanismos moleculares que involucran estos cambios epigenéticos (Amor y Halliday, 2008; Santos *et al.*, 2010).

Las anomalías en el desarrollo no están limitadas exclusivamente al desarrollo *in vitro* como ya se ha comentado, sino que también son consecuencia de determinadas condiciones experimentadas *in vivo*. Observándose por ejemplo disminución en el tamaño y un retraso en el desarrollo embrionario, además de una mortalidad embrionaria más elevada provocados por los tratamientos de superovulación empleados en las técnicas de reproducción asistida, debido a que provocan alteraciones epigenéticas en los ovocitos (Loneragan *et al.*, 2007).

1.3.1. EFECTO DE LA CRIOCONSERVACIÓN SOBRE LA REPROGRAMACIÓN EMBRIONARIA.

Durante los últimos años la crioconservación embrionaria y la transferencia se han convertido en técnicas rutinarias en el ámbito de la reproducción asistida en humanos. La crioconservación de embriones es utilizada con el objetivo de almacenar aquellos embriones que no van a ser transferidos inmediatamente. Pero más allá del campo de la reproducción humana, la crioconservación embrionaria también supone una herramienta útil para la

creación de bancos con el objetivo preservar la biodiversidad animal *ex situ* (Marco-Jiménez *et al.*, 2013), conservar recursos genéticos de interés asociados a los programas de selección genética o facilitar su difusión (García y Baselga, 2002; Lavara *et al.*, 2011).

Esta técnica ha sido considerada como neutral, debido a que pese a que podía tener efectos letales sobre algunos embriones, aquellos que lograban sobrevivir al proceso no parecían ser alterados (Aurox *et al.*, 2004). Pero durante los últimos años esta afirmación ha sido cuestionada, y se ha centrado la atención en la neutralidad o no de la crioconservación y en la evaluación de sus efectos a largo plazo (Sáenz de Juano *et al.*, 2014). En los embriones de conejo, se sabe que la crioconservación conlleva cambios que inducen alteración en los patrones de expresión genética que se traducen en modificaciones en el desarrollo fetal que en ocasiones desencadenan un aumento de las pérdidas fetales. Entre las alteraciones debidas a las condiciones de crioconservación se han observado alteraciones en la expresión de transcritos específicos relacionados con el desarrollo, el metabolismo, el estrés oxidativo y la apoptosis tanto en embriones crioconservados de 6 días como en tejido placentario de fetos de 14 días (Vicente *et al.*, 2013; Saenz de Juano *et al.*, 2014), pero se conoce poco sobre los efectos a largo plazo.

Los resultados obtenidos por Saenz de Juano *et al.*, (2014) demuestran que la vitrificación afecta no solo a la expresión de genes y proteínas en el día 14 de desarrollo, sino que además se observa una reducción en los pesos placentarios para ese mismo punto de la gestación, sugiriendo que las alteraciones causadas por la vitrificación no son completamente resueltas en aquellos embriones que superan la implantación. No solo esto, sino que además se observan alteraciones en las rutas lipolíticas y lipogénicas y del proteoma hepático de los fetos a nivel lipolítico, según los estudios realizados por el mismo grupo de investigación (comunicación personal, datos no publicados), muestran diferencias en el transcriptoma de hígados entre individuos procedentes de embriones vitrificados y embriones control. Los hígados procedentes de embriones vitrificados presentan una sobreexpresión en genes relacionados con el metabolismo lipídico (ELOVL4, CYP7A1) y una baja expresión en genes relacionados con el metabolismo del colesterol (APOA4, LIPC, CLN6), lo que podría explicar diferencias fenotípicas en la población en las que los individuos procedentes de embriones vitrificados presentan un tamaño de hígado reducido en un 10% en comparación a los individuos control. Otros estudios realizados por Lavara *et al.*, (2014) han demostrado que procesos como la vitrificación y la transferencia provocan una disminución en la viabilidad embrionaria y no solo eso, sino que además se observa un efecto a largo plazo cuando las hembras provenientes de la descendencia muestran una tasa reproductiva mayor, asociando estos efectos a largo plazo con las posibles modificaciones epigenéticas introducidas durante el proceso de vitrificación y transferencia o durante la gestación.

2. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el proceso de vitrificación de embriones induce alteraciones en el desarrollo prenatal y prepuberal en el conejo, evaluando el crecimiento a lo largo de la gestación y en las 9 primeras semanas de vida, y estudiando a nivel hepático la expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismo lipídico (ELOVL4, CYP7A1), el metabolismo del colesterol (APOA4, LPC, CLN6), y sobre crecimiento (IGF-I), además se estudiaron diversos metabolitos relacionados con la función hepática (ácidos biliares, bilirrubina total, colesterol, albúmina y glucosa).

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. ANIMALES.

Los conejos utilizados pertenecían al Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV)(Figura 6). Todos ellos provenían de la línea genética A de origen Neozelandés blanco, esta línea ha sido seleccionada desde 1980 por el carácter tamaño de camada. Las hembras donantes o receptoras de embriones tenían una edad comprendida entre los 4 meses y medio y los 5 meses, siendo las donantes de embriones inseminadas con el semen de machos adultos de entre 8 y 12 meses de edad de la misma línea.

Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con los principios de cuidados animales publicados en el Real Decreto Español 53/2013 (BOE, 2013; BOE= Boletín Oficial del Estado). Este estudio forma parte del proyecto de investigación AGL2014-53405-C2-1-P aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad Politécnica de Valencia.



Figura 6. Línea amarilla de conejo neozelandés del ICTA.

3.2. RECUPERACIÓN, VITRIFICACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

Las conejas donadoras de embriones fueron artificialmente inseminadas con una mezcla heterospérmica, de al menos, tres machos con una movilidad espermática superior al 70% y un porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales inferior al 15%. Tras la inseminación las hembras fueron inducidas a ovular con 1 μ g de acetato de buserilina (Suprefact, Hoechst Marion Roussel S.A, Madrid, España) y 72 horas después sacrificadas mediante una inyección intravenosa de 0.6g de pentobarbital sódico (Doléthol®, Vétoquinol E.V.S.A., Madrid, España)

Los embriones en estadio de mórula fueron recuperados mediante perfusión de los oviductos y los cuernos uterinos con 10 mL de tampón fosfato salino Dulbecco (DPBS) suplementado con 0.2% (p/v) de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Los embriones fueron clasificados en base a criterios morfológicos, considerándose normales aquellos embriones en estadio de mórula compactada o blastocisto temprano que presentaban una masa de células homogénea y ninguna anomalía en la CM y ZP, estos fueron distribuidos en grupos de entre 12 y 15 embriones, para su transferencia en fresco (no vitrificado) o vitrificación.

Las mórulas fueron vitrificadas según la metodología descrita por Vicente *et al.* (1999). Brevemente, el proceso de vitrificación se lleva a cabo en dos pasos a 20°C. En el primero de ellos, los embriones son sumergidos durante 2 minutos en la solución de vitrificación que consiste en 12.5% (v/v) de dimetil sulfoxido (DMSO) y 12.5% (v/v) de etilenglicol (EG) en DPBS suplementado con 0.2% (p/v) de BSA. En el segundo paso, los embriones son sumergidos durante 30 segundos en una solución que consiste en el 20% (v/v) de DMSO y 20% (v/v) de EG y DPBS suplementado con 0.2% (p/v) de BSA. Tras esto, los embriones sumergidos en la solución de vitrificación son cargados en pajuelas de plástico de 0.25 mL, añadiendo dos secciones de DPBS en ambos extremos de la pajuela y separando cada fracción con burbujas de aire. Finalmente, las pajuelas son cerradas con un tapón de plástico en el que figura el código de identificación de la donante y sumergidas en nitrógeno líquido. La desvitrificación se realiza situando la pajuela en posición horizontal y a unos 10 cm de distancia de nitrógeno líquido durante unos 30 segundos, tras esto comienza el proceso de cristalización y se sumergen las pajuelas en un baño de agua a 20°C durante 10-15 segundos. El medio de vitrificación se elimina posteriormente introduciendo los embriones durante 5 minutos en una solución que contiene DPBS y sacarosa 0.33M, seguido por un baño en una solución de DPBS durante otros 5 minutos.

Los embriones morfológicamente normales fueron transferidos mediante laparoscopia a los oviductos de un total de 16 hembras receptoras, siguiendo el proceso descrito por Besenfelder y Brem (1993). La ovulación fue inducida en cada una de las conejas receptoras con una inyección intramuscular de 1 µg de Acetato de Buserelina (Suprefact, Hoechst Marion Roussel S.A, Madrid, España) en un período de 68-72 horas tras la transferencia. Para anestesiar a las conejas durante la laparoscopia se utilizó una inyección intramuscular de 16 mg de xilacina (Bayer AG, Leverkusen, Alemania), seguida a los 5 minutos por una inyección intravenosa de entre 16 y 20 mg de ketamina hidrociorada (Imalgène, Merial SA, Lion, Francia). Durante la laparoscopia se administraron 12 mg de morfina hidrociorada (Morfina, B.Braun, Barcelona, España) intramuscularmente. Tras la cirugía las conejas fueron inyectadas intramuscularmente con 1 mL de una solución con antibióticos (200 IU penicilina procaína y 0,250 mg de estreptomina por mL, Duphaphen Strep, Pfizer, S.L.).

3.3. OBTENCIÓN DEL GRUPO CONTROL

El grupo control fue obtenido sin el empleo de las técnicas de vitrificación y transferencia anteriormente explicadas, sino que se empleó la monta en un total de 8 conejas nulíparas de la misma línea genética (línea A).

3.4. SEGUIMIENTO MEDIANTE ULTRASONOGRAFÍA

Ocho conejas de cada grupo experimental (control, fresco y vitrificado) fueron examinadas en los días 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 27 de la gestación, mediante un equipo portátil de ultrasonografía de Doppler (Esaote, España), con una sonda lineal de 7.5 MHz (con un rango de 4-12 MHz). Previamente, las conejas fueron anestesiadas con una inyección intramuscular de 35 mg/Kg de ketamina y 16 mg/Kg de xilacina, y además se rasuró el abdomen de las conejas. Las conejas fueron situadas en una pieza de poliuretano para prevenir los posibles

movimientos bruscos del animal durante el proceso. El examen mediante ultrasonografía fue realizado de derecha a izquierda con la sonda en orientación sagital, y se identificaron y midieron de 6 a 7 fetos por hembra. Las estructuras identificables (saco fetal, feto y las placentas fetales y maternas) fueron medidas a partir de las imágenes registradas, utilizando el programa Esaote 16 ultrasonografía. Las medidas están ilustradas en la Figura 7. Para el feto completo se midió la longitud cráneo-caudal (CRL), la cual abarca la distancia completa desde la cabeza a la cola con el feto en posición sagital (Figura 7.A). Para el saco fetal (FS) (Figura 7.B), se consideró la mayor superficie mostrada en la pantalla. El tamaño de la placenta es difícil de evaluar, pero se consideraron los dos lóbulos fetales (L1FP y L2FP) y se hizo el promedio de ambos (FP) y la placenta materna (MP), las cuales aparecen definidas en la pantalla (Figura 7.B).

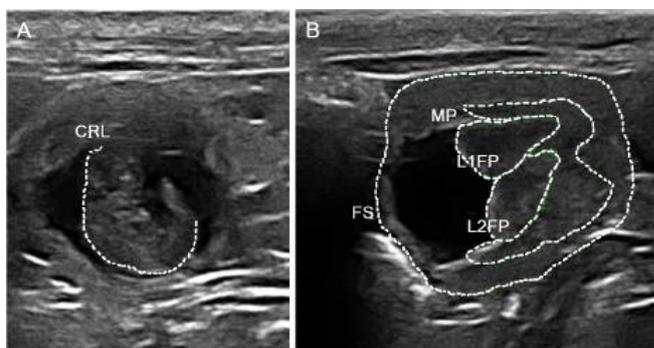


Figura 7. Medidas mediante ultrasonografía del feto (A) y placentas (B) (Sáenz de Juano, 2014).

3.5. CRECIMIENTO DURANTE LAS 9 PRIMERAS SEMANAS DE VIDA.

Los conejos nacidos de los tres grupos permanecieron con sus madres durante 28-30 días, momento en el que fueron destetados y trasladados a jaulas donde se agruparon a los animales de 9 en 9 con libre acceso a agua y comida (Pienso medicamentoso CUNIVITA TR, NANTA S.A, Valencia, España). El fotoperiodo entre el destete y la novena semana de vida fue de 8 horas de luz alternadas con 16 horas de oscuridad. Los animales fueron pesados al nacimiento, al destete y durante el período de cebo semanalmente.

3.6. DISECCIÓN DE LOS ANIMALES.

Conejos de 9 semanas de vida de cada uno de los grupos (52 controles, 58 frescos y 42 vitrificados) fueron sacrificados y diseccionados para obtener el peso de los siguientes órganos: riñones, glándulas suprarrenales, hígado, bazo, pulmones, corazón, testículos y epidídimo.

3.7. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HÍGADO Y SANGUÍNEAS.

Se emplearon un total de 24 muestras de hígado (Figura 8) de individuos de 9 semanas de vida, 8 por cada grupo, procedentes de embriones vitrificados, embriones frescos y embriones que no han sufrido ningún tipo de manipulación. Los animales fueron sacrificados con 0,6 g de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A.), obteniéndose

posteriormente las muestras de hígado. Estas fueron almacenadas en criotubos con 600 μ L de RNA later[®] (Qiagen Iberia SL, Madrid, España) durante 24 horas y posteriormente almacenadas a -20°C.



Figura 8. Hígado de conejo.

Para la obtención de muestras sanguíneas se emplearon el mismo número de animales para los 3 grupos que en el caso anterior. La sangre se recuperó mediante un tubo Vacutainer heparinizado (LH/Li Heparine tube TAPVAL[®], MonLab, SL.Barcelona, España). Posteriormente, se centrifugó a 3000g y 4°C durante 10 minutos con el fin de separar el suero, el cual se guardó a -80°C hasta su utilización.

3.8. EXTRACCIÓN DE RNA Y qPCR.

El RNA total fue aislado utilizando el método tradicional de extracción con fenol/cloroformo mediante homogeneización con bolas metálicas utilizando el homogeneizador Fast-Prep[®]-24 (MP Biomedicals, Illkrich Cedex, Francia). La concentración, calidad e integridad fueron evaluadas mediante el uso del equipo espectrofotométrico Nanodrop 200 (Thermo Scientific[®], Wilmington, Delaware, Estados Unidos). Para prevenir la contaminación por DNA, se realizó un paso de deoxiribunucleasas (gDNA Wipeout Buffer, Qiagen Iberia S.L, Madrid, España) para el total del RNA (1000ng). Tras esto se llevó a cabo la transcripción reversa utilizando el kit Reverse Transcriptase Quantitect (Qiagen Iberia SL, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación relativa de los genes objeto de este estudio se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo Real (RT qPCR) con el termociclador modelo 7500 de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la enzima SYBR[®] Green como sistema de detección.

Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos con un volumen final por reacción de 20 μ L. En cada reacción se utilizaron 10 μ L de la solución SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems), que contiene todo lo necesario para llevar a cabo la reacción: la enzima AmpliTaq Gold[®], el marcador SYBR[®] Green y los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs). También se añadieron 2 μ L de la referencia pasiva ROX[™] (6-carboxy-X-rhodamine) para normalizar las reacciones y evitar las fluctuaciones de fluorescencia de los pocillos por errores en el pipeteo o evaporación de las muestras. Finalmente, se añadió 1 μ L de cada uno de los primers a 100 nM y de 5 μ L de cDNA diluido (1:40).

Tras la RT qPCR, se realizó un análisis de curva de fusión, incrementando lentamente la temperatura desde 65°C a 95°C, con un continuo almacenamiento de los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida. Se emplearon las medias geométricas de los genes H2AFZ (miembro Z de la familia de las histonas H2A) (Mamo *et al.*, 2008) y GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (Santos *et al.*, 2008), como factores de normalización para ajustar la eficiencia de la PCR, y la expresión relativa de una mezcla de cDNA de todas las muestras fue utilizada como calibrador.

Tabla 1. Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real, secuencia, código de acceso de los mismos y tamaño del fragmento amplificado para los genes histona (H2AFZ), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), apolipoproteína A (APOA4), elongasa de ácidos grasos 4 (ELOVL4), lipasa hepática (LIPC), lipofuscinosis ceroides neuronal 6 (CLN6) y factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) y el polipéptido 1 de la subfamilia A de la familia 7 del citocromo P450 (CYP7A1).

Gen	Secuencia	Código de acceso	Tamaño amplificado (pb)
H2AFZ	Fw - 5' AGAGCCGGCTGCCAGTTCC 3' Rv - 5' CAGTCGCGCCACACGTCC 3'	AF030235	85
GAPDH	Fw - 5' GCCGCTTCTTCTCGTGACAG 3' Rv - 5' ATGGATCATTGATGGCGACAACAT 3'	L23961	144
APOA4	Fw - 5' ACTTCTCGCAGCTGAGCAAC 3' Rv - 5' GAGCTTGTCTGGAAGAGGTT 3'	ENSOCUG00000011233	98
ELOVL4	Fw - 5' CATGGGATCATATAATGCAGGA 3' Rv - 5' AAAGTACCACCATAAAGCAGCA 3'	ENSOCUG00000005334	103
LIPC	Fw - 5' ATGCAGAAAAATCCCATCAC 3' Rv - 5' CCAAATTCAGCGTGATCAGA 3'	ENSOCUT00000001646	79
CLN6	Fw - 5' AGAACTGGGTGCTGGACTTC 3' Rv - 5' ATGACGTTGTAGGCCATGTG 3'	ENSOCUT00000017532	115
IGF-I	Fw - 5' TGGTGGATGCTCTTCAGTTCGTGT 3' Rv - 5' GCTGATACTTCTGAGTCTTGGGCA 3'	NM_001082026.1	237
CYP7A1	Fw - 5' GCCCTGAAAGCAGCTACTGA 3' Rv - 5' GGGACTCCTTGATGATGCTG 3'	ENSOCUT00000012281	151

3.9. ANÁLISIS DE METABOLITOS DE FUNCIÓN HEPÁTICA.

El análisis de los metabolitos hepáticos fue realizado por el laboratorio del Hospital Clínico Veterinario (HCV) de la Universidad CEU-Cardenal Herrera. Fueron analizadas un total de 24 muestras, 8 muestras por grupo, y en cada una de ellas se determinó la concentración plasmática de Ácidos Biliares, Bilirrubina total, Colesterol, Albúmina y Glucosa, mediante el equipo Spin 200E (Spinreact, Girona, España) y los reactivos de la misma casa comercial.

Brevemente, en el caso de los ácidos biliares junto con la presencia de Tio- NAD, la enzima 3- α hidroxisteroide dehidrogenasa (3- α HSD) convierte los ácidos biliares en 3-ceto esteroides y Tio-NADH. La reacción es reversible y 3- α HSD puede convertir los 3-ceto esteroides y Tio-NADH en ácidos biliares y Tio-NAD. En presencia de exceso de NADH, la variación cíclica de las enzimas (Figura 9) se produce de forma eficaz y la tasa de formación de Tio-NADH se determina midiendo el cambio específico de la absorbancia a 405 nm.

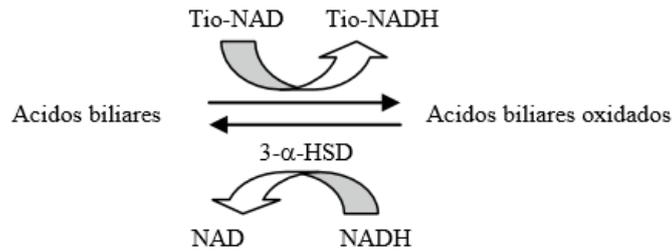


Figura 9. Reacción enzimática para la determinación de ácidos biliares (protocolo Spinreact para la determinación de ácidos biliares totales).

Para el caso de la bilirrubina total, esta se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada.

La concentración de colesterol en la muestra es medida mediante un ensayo enzimático colorimétrico representado en la Figura 10, en el cual los ésteres de colesterol son catalizados mediante la enzima colesterol esterasa (CHE) a colesterol y ácidos grasos. El colesterol en presencia de oxígeno y la enzima colesterol oxidasa (CHOD) es convertido a 4-colesterona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno en presencia de fenol, 4-aminofenazona y la enzima peroxidasa (POD) producen quinonimina. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.

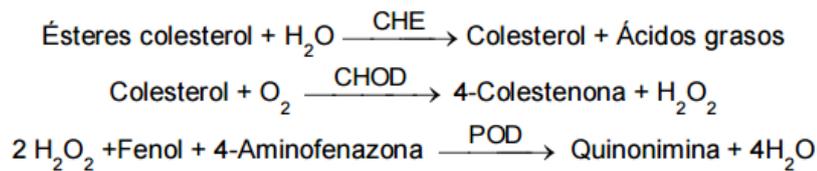


Figura 10. Reacción enzimática y colorimétrica para la determinación de colesterol (protocolo de Spinreact para la determinación de colesterol).

La técnica empleada en el caso de la determinación de la albúmina se basa en la combinación con el verde bromocresol a pH ligeramente ácido, produciéndose así un cambio de color del indicador de amarillo verdoso a verde azulado, proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra.

Por último la determinación de la glucosa está basada en el método de la glucosa oxidasa (GOD) (Figura 11), que cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de peroxidasa. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

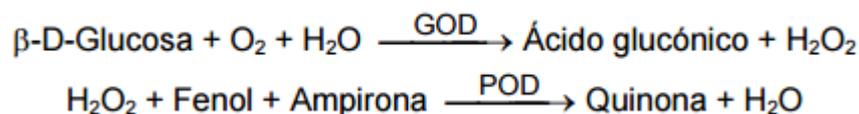


Figura 11. Reacción enzimática para la determinación de la glucosa (protocolo de Spinreact para la determinación de la glucosa).

3.10. NIVELES SÉRICOS DE IGF-I.

El nivel sérico de IGF-I se determinó mediante la técnica de ensayo directo inmunoenzimático (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (IGF-I Elisa Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Texas, EEUU).

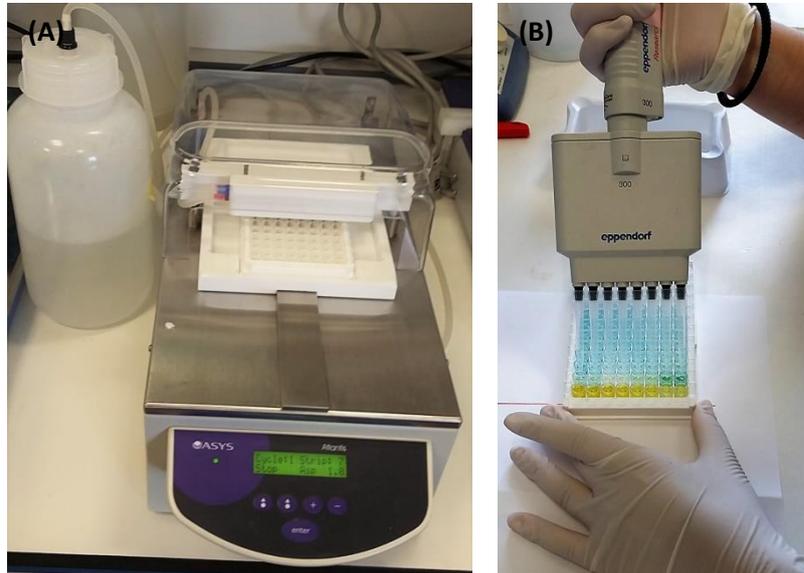


Figura 12. Realización del ensayo ELISA, lavador automático de placas (A), detección de la reacción enzimática (B).

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para analizar el efecto de la vitrificación sobre la longitud de los fetos, la placenta materna, la placenta fetal y la bolsa fetal se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el tipo de embrión (Control, Fresco o Vitrificado) como factor fijo, la coneja como factor aleatorio y el número de embriones implantados como covariable.

El efecto de la vitrificación sobre el crecimiento se analizó con un modelo lineal general que incluía el efecto tipo de embrión y las covariables número de nacidos, número de destetados y edad al sacrificio (en torno 9 semanas) para analizar respectivamente el peso al nacimiento, destete y peso a las 9 semanas. Los órganos obtenidos tras la disección fueron analizados mediante un modelo lineal que incluía como factor fijo el tipo de embrión y la covariable peso al sacrificio.

Para analizar los datos de la abundancia relativa del RNA mensajero se realizó una normalización previa de los datos mediante una transformación logarítmica de los mismos, y al igual que los metabolitos hepáticos y la concentración plasmática de IGF-I se realizó un ANOVA usando como factor fijo el tipo de embrión.

Los análisis se realizaron con el software SPSS 16, considerándose como datos estadísticamente significativos aquellos que tenían un P-valor menor a 0.05.

3.12. DISEÑO EXPERIMENTAL.

A modo de resumen el diseño experimental seguido en el trabajo es el mostrado en la Figura 10.

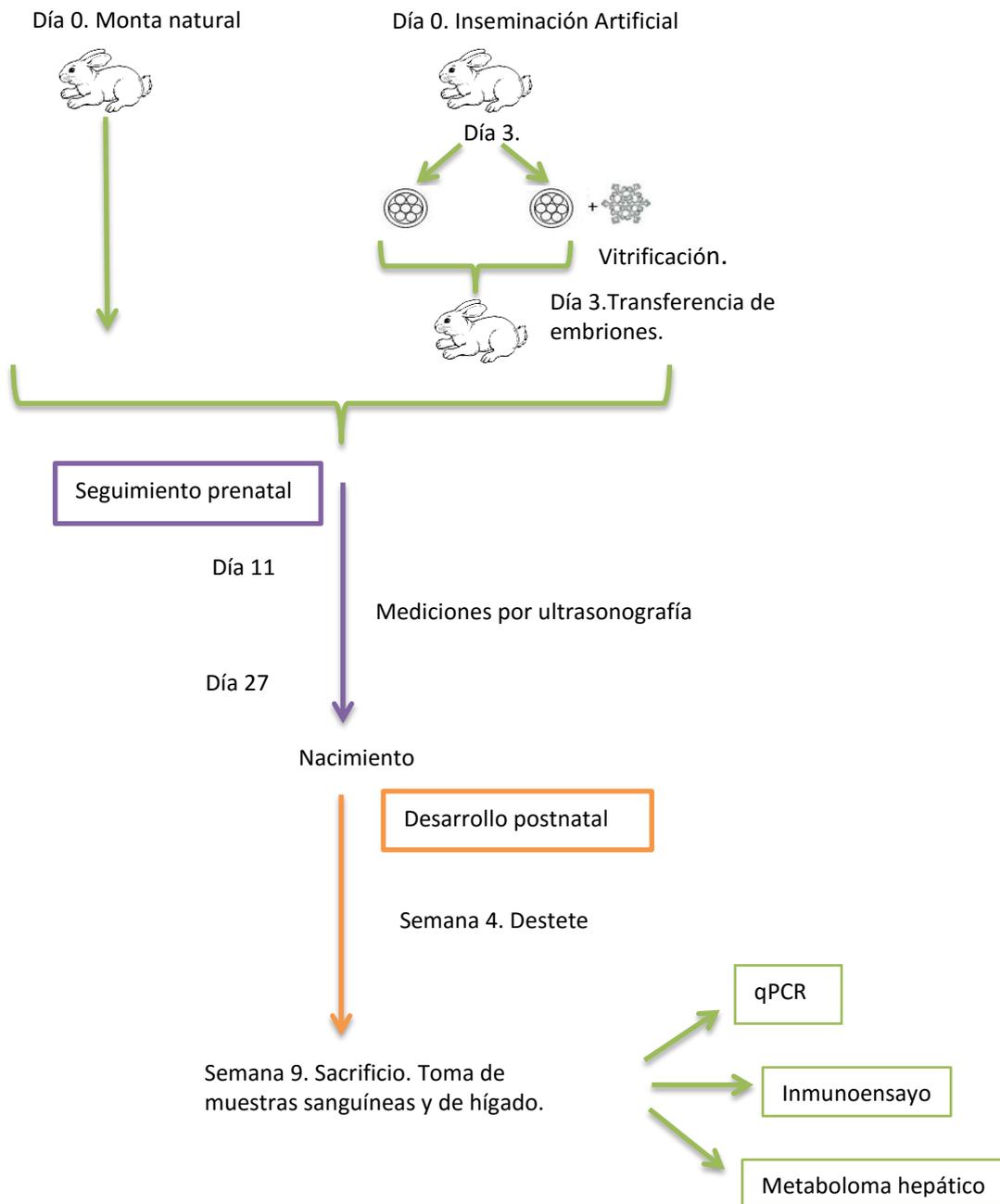


Figura 13. Diseño experimental.

4. RESULTADOS.

4.1. DESARROLLO PRENATAL.

Los resultados obtenidos para el Saco Fetal (FS), la Placenta Fetal (FP), la Placenta Materna (MP), así como para la Longitud del Feto (CRL) mediante ultrasonografía para diferentes días de la gestación, se muestran en las Figuras 14, 15, 16 y 17 respectivamente.

Para el caso de la FS se observan diferencias en su tamaño favorables al grupo control sobre los vitrificados y frescos hasta el día 18, tendencia que se invierte al final de la gestación, siendo en el día 25 mayor la superficie de la bolsa fetal del grupo de embriones vitrificados (Figura 14).

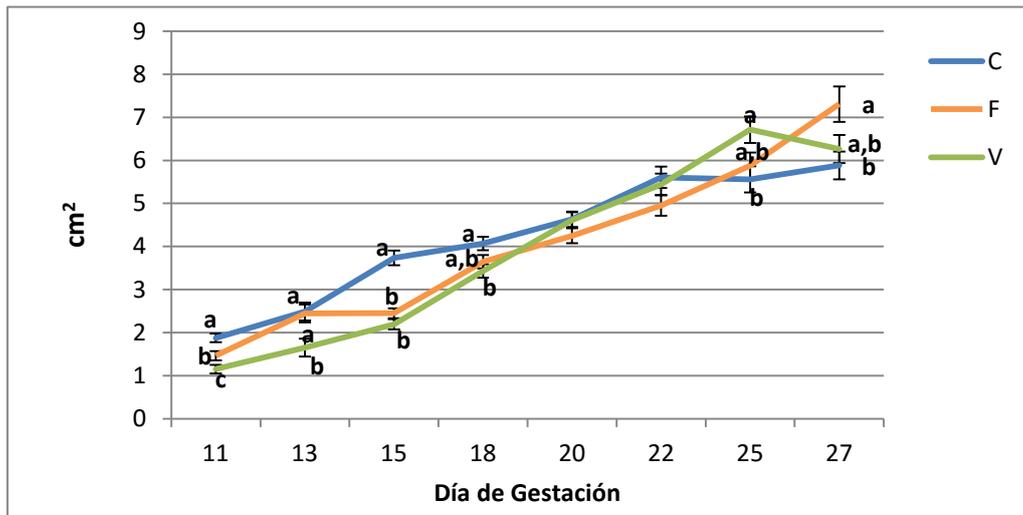


Figura 14. Evolución del área del Saco Fetal (FS) durante la gestación. Valores para cada día con letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

En el caso de la FP se observa que los embriones procedentes del grupo control presentan un área mayor respecto a los otros dos grupos que llevan un retraso en su desarrollo hasta el día 18 de la gestación en el cual los tres grupos se igualan (Figura 15).

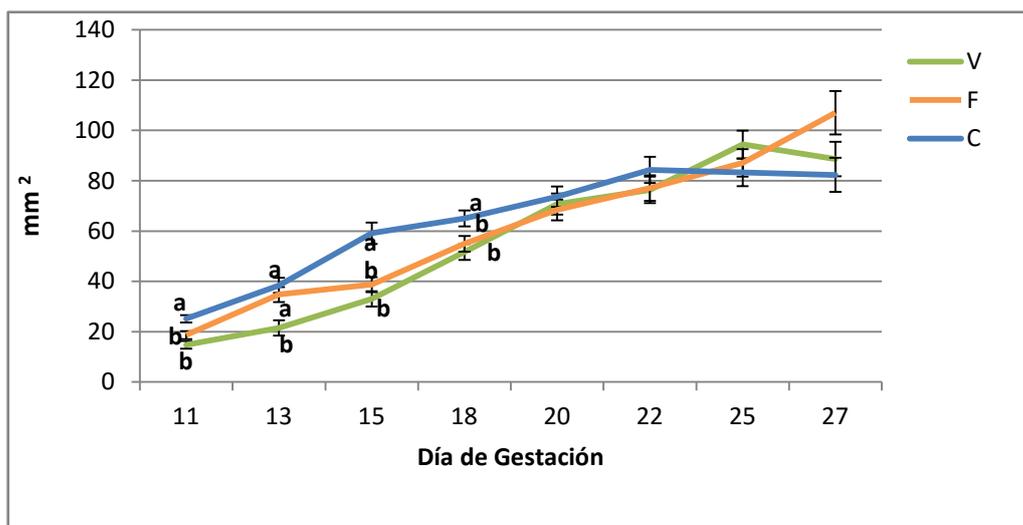


Figura 15. Evolución del área de la Placenta Fetal (FP) durante la gestación. Valores para cada día con letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Algo similar ocurre para el caso de la MP, en la cual se observa un desarrollo mayor para el grupo control hasta el día 15 de la gestación respecto a los embriones frescos y vitrificados (Figura 16).

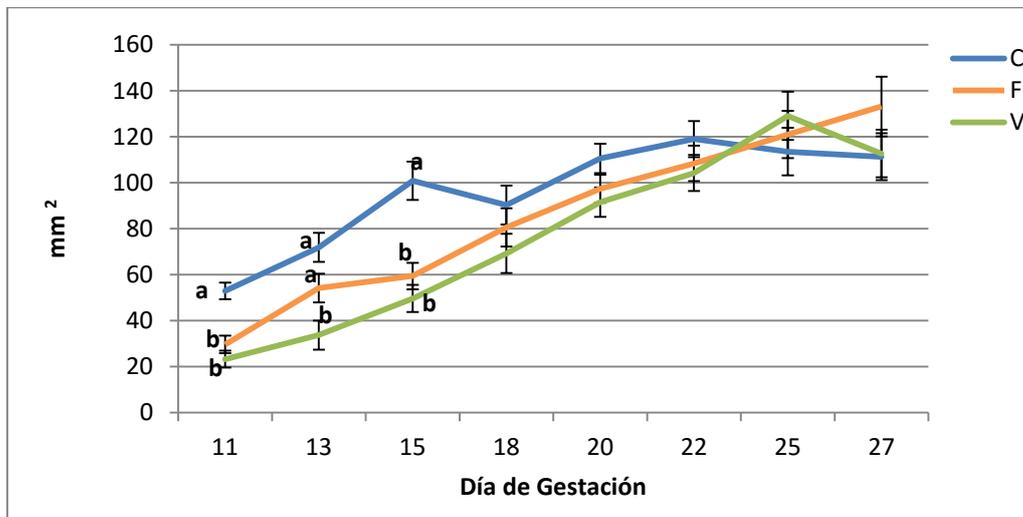


Figura 16. Evolución del área de la Placenta Materna (MP) durante la gestación. Valores para cada día con letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Respecto a la CRL durante la gestación se observa que desde el día 11 hasta el 22 el grupo control presenta longitudes mayores respecto a los vitrificados y frescos, mientras que el día 25 y 27 los tres grupos muestran longitudes similares (Figura 17).

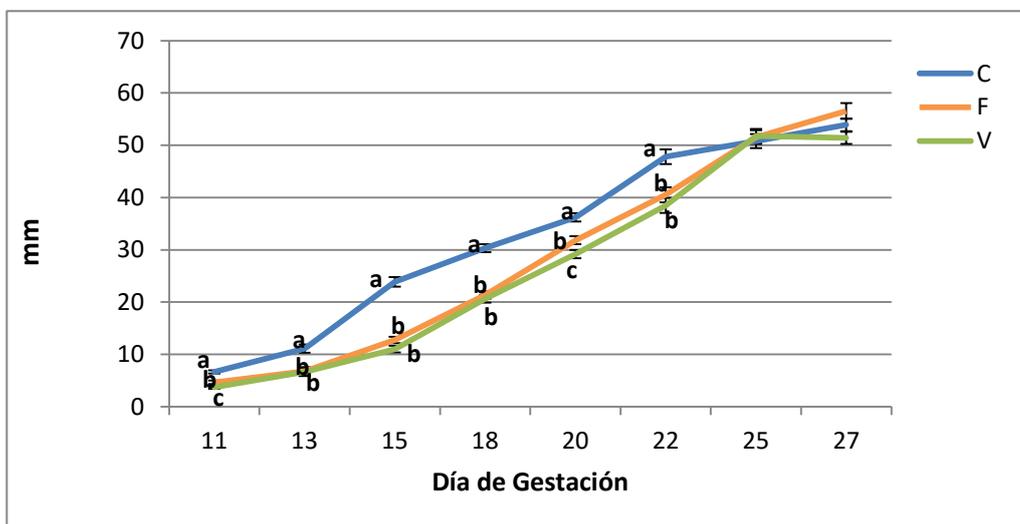


Figura 17. Evolución de la Longitud del Feto CRL durante la gestación. Valores para cada día con letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

4.2. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO AL NACIMIENTO, DESTETE Y SACRIFICIO.

Los pesos tomados al nacimiento, destete y a los 63 días de los animales (Tabla 2), revelan diferencias estadísticamente significativas al final del período de engorde (63 días), mostrándose los animales procedentes de individuos vitrificados con un peso más elevado.

Tabla 2. Resultados de los pesos tomados al nacimiento, destete y a los 63 días.

Tipo	Peso al nacimiento (g)	Peso al destete (g)	Peso a los 63 días (g)
Control	51±2.4	680±30.8	1791±24.8 ^b
Fresco	52±2.2	626±30.4	1833±34.3 ^b
Vitrificado	60±3.5	647±40.3	1944±35.4 ^a

Los superíndices ^{a,b} en la misma fila representan valores estadísticamente significativos (P<0.05).

4.3. DISECCIONES DE LOS CONEJOS CON 9 SEMANAS.

Los resultados de los pesos de los diferentes órganos evaluados tras la disección de los animales se muestran en la Tabla 3. Tras ajustar el modelo con el peso del animal al sacrificio, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el hígado, pulmones y glándulas suprarrenales de los tres grupos observados. Mostrándose un peso mayor de hígado en el grupo de los vitrificados y un peso mayor de pulmones y glándulas suprarrenales en los frescos.

Tabla 3. Resultados de las disecciones de conejos de 9 semanas de vida.

Componente (Peso, g)	Grupo		
	Control (n=52)	Fresco (n=58)	Vitrificado (n=42)
Hígado	56.8 ±1.30 ^c	60.9±1.22 ^b	66.9±1.46 ^a
Riñones	12.3±0.16	12.4±0.15	12.7±0.18
Pulmones	14.8±0.54 ^b	17.3±0.52 ^a	14.5±0.62 ^b
Corazón	6.1±0.18	6.3±0.17	6.6±0.20
Testículos	1.6±0.06	1.6±0.06	1.5±0.07
Bazo	1.2±0.03	1.2±0.03	1.0±0.04
Glándulas Suprarrenales	0.2±0.015 ^c	0.3±0.014 ^a	0.3±0.017 ^b

n representa el número de muestras.

Los superíndices ^{a,b,c} en la misma fila representan valores estadísticamente significativos (P<0.05).

4.4. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA TRAS LA TRANSFERENCIA Y VITRIFICACIÓN.

El análisis de la varianza de los datos normalizados para los 6 genes candidatos (APOA4, ELOVL4, LIPC, CLN6, IGF-I y CYP7A1), no mostró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los hígados procedentes de los tres grupos (control, fresco y vitrificado) como se muestra en la Figura 18. No obstante, los genes APOA4, LIPC y CLN6 muestran diferencia con una $P < 0.10$.

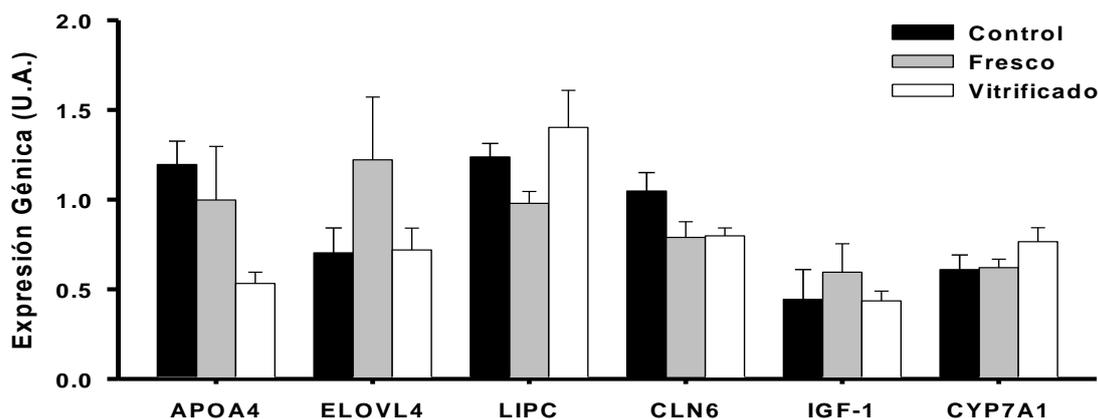


Figura 18. Expresión génica de los genes seleccionados.

4.5. RESULTADOS DE LOS METABOLITOS DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA.

Los resultados obtenidos tras el análisis hepático en el cual se evaluó la concentración plasmática de ácidos biliares, albúmina, bilirrubina, colesterol y glucosa en el momento del sacrificio se muestran en la Tabla 4.

Los niveles séricos de IGF-I en el momento del sacrificio de los animales fueron estadísticamente significativos ($P < 0.05$), mostrándose concentraciones más elevadas en los individuos del grupo control, respecto a los frescos y vitrificados, como se muestra en la Tabla 4.

Por el contrario, no se observan diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones del resto de los metabolitos. No obstante cabe reseñar que los niveles de colesterol y glucosa mostraban diferencia con $P < 0.10$.

Tabla 4. Concentraciones de metabolitos e IGF-I.

Metabolito	Grupo		
	Control (n=8)	Fresco (n=8)	Vitrificado (n=8)
Ácidos Biliares (mol/mL)	20.9 ± 2.5	17.8 ± 2.4	17.6 ± 2.4
Albúmina (g/dL)	4.1 ± 0.07	4.1 ± 0.07	4.1 ± 0.07
Bilirrubina (mg/dL)	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.04	0.21 ± 0.04
Colesterol (mg/dL)	67.3 ± 3.7	56.5 ± 3.6	60.3 ± 3.7
Glucosa (mg/dL)	151.9 ± 2.5	155.9 ± 2.3	159.7 ± 2.4
IGF-I (ng/mL)	334 ± 13.6 ^a	279 ± 12.9 ^b	293 ± 13.3 ^b

n representa el número de muestras.

Los superíndices ^{a,b} en la misma fila representan valores estadísticamente significativos (P<0.05).

5. DISCUSIÓN.

Los embriones desarrollan mecanismos para adaptarse a las condiciones ambientales y al ambiente uterino en el cual se desarrollan para minimizar los posibles efectos adversos que estos puedan ejercer sobre su desarrollo, pese a esto, en muchas ocasiones estas adaptaciones implican modificaciones sobre su desarrollo prenatal y postnatal (Fleming *et al.*, 2004). Es en relación a esto donde surge la hipótesis de la “enfermedad de origen fetal” ya comentada con anterioridad, la cual sostiene que problemas en la descendencia adulta tienen su origen en las adaptaciones que sufre el embrión y/o feto en las etapas tempranas de su desarrollo (Hoche, 2014). Es decir, que un evento acontecido en las etapas tempranas del desarrollo del individuo como podría ser la vitrificación, o la manipulación del embrión extrayéndolo de su ambiente uterino, podría alterar de forma permanente la estructura y función de determinados órganos en el intento de adaptarse a estos cambios.

Nuestros resultados van en concordancia con esta teoría, ya que el estrés que supone el proceso de vitrificación o la transferencia del embrión implican no solo modificaciones durante la gestación, sino variaciones en el tamaño de órganos que tienen un desarrollo muy temprano como las glándulas suprarrenales o con funciones esenciales en el desarrollo inicial de los individuos como el hígado, además de variaciones en las concentraciones de IGF-I.

La crioconservación de embriones de mamífero ha beneficiado en los últimos años no solo a la investigación biomédica, sino que además ha supuesto un gran avance en las técnicas de reproducción asistida (Lavara *et al.*, 2014). Pero a pesar de estas ventajas, se sabe que estas técnicas inducen cambios en el ambiente que rodea al embrión y efectos secundarios maternos que provocan cambios a nivel de expresión genética (Sáenz de Juano, 2014), patrones de metilación (Stojanov y O’Neill, 2001; Sáenz de Juano, 2014), y el perfil transcriptómico y proteómico de la placenta (Sáenz de Juano, 2014), pero poco se ha estudiado sobre los efectos que estas técnicas pueden tener a largo plazo. Algunos autores como Auroux *et al.* (2004) han encontrado un efecto positivo sobre la longevidad en individuos adultos, y Lavara *et al.* 2014, han encontrado efectos positivos en las características reproductivas de individuos que provenían de procesos de crioconservación.

Los resultados obtenidos por Sáenz de Juano. (2014) ya mostraban diferencias en el desarrollo de los fetos durante la gestación, en especial para el día 12 en la FS y la MP, los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran estas diferencias a lo largo de toda la gestación. Acorde con Symeon *et al.* (2015) la gestación en el conejo se divide en 3 etapas: (i) período entre la fecundación y la implantación, (ii) el período de organogénesis y (iii) el período de crecimiento fetal. La implantación tiene lugar 6-7 días después de la fecundación. El período de la organogénesis se da entre los días 7 y 18-19 y el crecimiento fetal desde el 19-30, siendo este muy rápido (Anderson y Henck, 1989). En conejo, se ha establecido que aproximadamente a día 19.5 se ha completado la apariencia fetal, finalizándose la organogénesis (Beaudoin *et al.*, 2003), dándose un crecimiento muy rápido desde este momento hasta finalizar la gestación (Symeon *et al.*, 2015) En base a los resultados obtenidos observamos que aquellos embriones que han sufrido una manipulación presentan un retraso en el desarrollo durante la gestación, pero cuando llegan aproximadamente al día 18 de la gestación, coincidiendo con el final de la organogénesis y el comienzo del crecimiento consiguen igualar al desarrollo de los individuos control para ponerse al mismo nivel de estos en el momento del nacimiento.

Respecto al crecimiento de los animales desde el momento de su nacimiento hasta la finalización del engorde, estos solo presentan diferencias una vez acabada la etapa de engorde, siendo los vitrificados los que presentan un peso mayor, lo que coincide además con el mayor peso del hígado que presentan estos animales. Diferencias en este órgano que se mantienen a pesar de introducir como covariable el peso del animal. Esto podría ser debido a que los tamaños de camada en los embriones vitrificados son menores que en el resto, por lo tanto los animales no tienen que competir por los recursos y se produce un efecto no solo debido a la técnica sino además maternal. Estos resultados no difieren de los resultados obtenidos por Sáenz de Juano. (2014), donde se demostraban diferencias significativas en el peso al nacimiento, siendo mayor para el grupo de los vitrificados. En este trabajo, el peso observado no difiere estadísticamente pero si se observa la tendencia a ser mayor.

Lavara *et al.* (2014) ya estudiaron los efectos que la vitrificación podía tener respecto al peso de determinados órganos en conejos adultos, aunque en ese momento ya se encontraron diferencias significativas respecto al peso de los hígados, en este momento se está incluyendo un grupo control el cual no ha sufrido ninguna manipulación embrionaria y se están tomando los datos en el período exponencial del crecimiento del conejo. Además aparte de mostrarse diferencias en los pesos del hígado, también aparecen diferencias en el peso de pulmones y glándulas suprarrenales. Otros autores como Mahsoudi *et al.* (2007) y Calle *et al.* (2012) han observado también que la manipulación de embriones de ratón preimplantacionales presentan alteraciones en el tamaño de los órganos. Respecto al hígado, estos estudios son concordantes con los obtenidos por Sáenz de Juano. (2014), en el que se demostró que la crioconservación embrionaria induce cambios en la función de la placenta alterando rutas lipolíticas y lipogénicas, además de en el proteoma hepático de los fetos a nivel lipolítico, cosa que podría tener consecuencias en el desarrollo postnatal como se ha observado en este estudio con diferencias en el peso a las 9 semanas de vida. Las glándulas suprarrenales son un órgano el cual se desarrolla muy temprano, el hecho de que el peso de éstas sea mayor en los embriones que han sufrido algún tipo de manipulación, indica que el proceso está afectando a su desarrollo de algún modo potenciándolo.

Por el contrario y pese a que el hígado es el mayor productor de IGF-I (Ohlsson *et al.*, 2009), un aumento en el tamaño del hígado no ha ido acompañado de una mayor concentración de IGF-I en los individuos. Pero esta asociación también fue demostrada *in vitro* donde embriones que fueron cultivados *in vitro* mostraron unos niveles de expresión de IGF-I más bajos que aquellos que se desarrollaron *in vivo*, lo que indicaría que el hecho de modificar las condiciones del entorno del embrión puede estar afectando a la producción de IGF-I y esto mantenerse a lo largo del desarrollo del individuo (Stojanov y O'Neill, 2001).

A pesar de que se habían observado diferencias en el transcriptoma de hígados fetales entre individuos procedentes de los grupos control y vitrificado, estos últimos presentando sobreexpresión de genes relacionados con procesos apoptóticos (CECR2, TRIB3, EGLN3), y del metabolismo lipídico (CYP7A1, ELOVL4) y una baja expresión en genes relacionados con procesos de división y proliferación celular (HAUS2, PTTG1, CENPH, RBP5, TMED6 entre otros) y metabolismo del colesterol (APOA5, LIPC, APOA4, CLN6). Los resultados obtenidos en este estudio mediante qPCR no han mostrado diferencias estadísticamente significativas en los

genes candidatos estudiados en conejos en crecimiento, pero muestran diferencias que deben estudiarse incrementando el tamaño muestral.

Bajo la hipótesis de que las alteraciones causadas en la etapa fetal puedan tener una repercusión sobre el desarrollo postnatal, estudiamos si la función hepática durante el periodo prepuberal mostraba signos de haber sido alterada. Así como hemos comentado anteriormente, el tamaño del hígado y la producción IGF-I se han visto afectados de modo inversamente proporcional, probablemente para compensar las necesidades en este periodo activo de crecimiento. Por el contrario, metabolitos de la función hepática como son sales biliares, colesterol, bilirrubina y albúmina aparentemente no han sufrido cambios. Ciertamente es, que no se ha demostrado una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a concentraciones, pero de nuevo se observa una tendencia que debe ser estudiada en conejos que provienen de embriones vitrificados, como es una concentración de glucosa y colesterol ligeramente más elevadas que el resto para una $P < 0.1$. No obstante, la concentración de glucosa en sangre puede venir determinada por otros factores como la ingesta del animal poco tiempo antes de su sacrificio, que podrían no ir asociados con ninguna patología y simplemente por el consumo del animal en un momento determinado antes de la extracción de la sangre. Los animales no fueron sometidos a ayuno con el fin de evitar su estrés, y se tuvo en cuenta que habitualmente inician su consumo de pienso al inicio del encendido de las luces (6 am) unas 3 horas antes del momento en el que fueron sacrificados. Es debido a esto por lo que surge la necesidad de aumentar en este caso también el número de muestras analizadas para poder evaluar diferencias con una robustez mayor y observar sus niveles en respuesta al ayuno. Unas conclusiones similares aparecen para el caso del colesterol, mostrándose una tendencia mayor en los individuos control, bien es cierto que en este estudio algunos de los genes analizados estaban relacionados con el metabolismo del colesterol, con lo cual un aumento de las muestras analizadas podría arrojar mayor luz acerca de si este metabolito relacionado con la función hepática puede estar sufriendo alteraciones.

Teniendo en consideración todos estos resultados, podría ser cuestionada la neutralidad del proceso de vitrificación, ya que se ha demostrado que esta plasticidad que tienen los embriones para adaptarse a condiciones adversas y poder continuar con su desarrollo frente a condiciones de estrés, puede inducir a su reprogramación, implicando alteraciones fisiológicas y metabólicas en los individuos en su fase exponencial de crecimiento y posteriormente en la edad adulta (Redondo, 2014). Resultados obtenidos por diversos autores, ya han demostrado que la vitrificación puede alterar los patrones epigenéticos de embriones en el desarrollo (Wang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012), pero además se ha demostrado que también pueden producirse alteraciones a nivel del desarrollo placentario y proteómico (Sáenz de Juano, 2014). Esto puede ser debido a que se producen eventos de reprogramación epigenética durante el desarrollo temprano de los embriones, estos eventos modulan los patrones de metilación del DNA y la remodelación de la cromatina (Khosla *et al.*, 2001). Estos patrones que son heredables, al presentarse en las etapas más tempranas del embrión pueden verse afectadas por determinadas perturbaciones ambientales como aquellas relacionadas con los medios de cultivo *in vitro*, o la manipulación embrionaria (Santos *et al.*, 2010).

A pesar de esto, nuevos estudios se deben de realizar para continuar evaluando los efectos del proceso de vitrificación, ampliando los estudios realizados en el hígado con otros genes

candidatos, y ampliarlo a otros órganos como pueden ser las glándulas suprarrenales, los riñones o el cerebro.

6. CONCLUSIONES.

La vitrificación de embriones podría inducir diferencias en el desarrollo prenatal del conejo, así como en los pesos de determinados órganos de desarrollo temprano y con una importante función en la etapa de crecimiento de los animales, si se comparan animales procedentes de embriones vitrificados, frescos o controles. Estas alteraciones podrían ser causadas por las adaptaciones de los embriones al estrés que al que se ven sometidos durante el procedimiento de vitrificación y transferencia, adaptaciones que de algún modo les ayudan en esa supervivencia, pero podrían traerles consecuencias a largo plazo.

Así hemos podido observar diferencias en:

- El desarrollo prenatal en la primera mitad de la gestación.
- Pesos al nacimiento y al final del período de engorde.
- Pesos de hígado, pulmones y glándulas suprarrenales al sacrificio.
- Concentraciones séricas de IGF-I.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- ADAMS, C.E. (1960). Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *J. Reprod. Fertil.*, 1: 36-44
- AMOR, D. J., & HALLIDAY, J. (2008). A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Human Reproduction*, 23(12), 2826–2834.
- ANDERSON, J. A., HENCK, J. W. (1994) Fetal development. The biology of the laboratory rabbit. *Academic Press*. pp 457
- APPARAO, K. B. C. (2002). Regulated Expression of Osteopontin in the Peri-Implantation Rabbit Uterus. *Biology of Reproduction*, 68(5), 1484–1490.
- ASHTON I.K., SPENCER E.M., (1983). Effect of partially purified human somatomedin on human foetal and postnatal cartilage in vitro. *Early Hum Dev* 8, 135-140.
- AUROUX, M., CERUTTI, I., DUCOT, B., & LOEUILLET, A. (2004). Is embryo-cryopreservation really neutral? A new long-term effect of embryo freezing in mice: Protection of adults from induced cancer according to strain and sex. *Reproductive Toxicology*, 18(6), 813–818.
- BARKER, D. J., GODFREY, K., GLUCKMAN, P., HARDING, J., OWENS, J., & ROBINSON, J. (1993). Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *The Lancet*, 341(8850), 938–941.
- BEAUDOIN, S., BARBET, P., & BARGY, F. (2003). Developmental stages in the rabbit embryo: Guidelines to choose an appropriate experimental model. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 18(6), 422–427.
- BESENFELDER, U.; BREM, G. (1993). Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J. Reprod. Fertil.*, 99: 53-56.
- BOWMAN, P., & MCLAREN, A. (1970). Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. *Development*, 23(3), 693–704.
- BOYER, L. A., MATHUR, D., & JAENISCH, R. (2006). Molecular control of pluripotency. *Current Opinion in Genetics and Development*, 16(5), 455–462.
- CALLE, A., MIRANDA, A., FERNANDEZ-GONZALEZ, R., PERICUESTA, E., LAGUNA, R., & GUTIERREZ-ADAN, A. (2012). Male Mice Produced by In Vitro Culture Have Reduced Fertility and Transmit Organomegaly and Glucose Intolerance to Their Male Offspring. *Biology of Reproduction*, 87(2), 1–9.
- CANALES, L., MICHELE PISANO, C., & NEAL, R. E. (2012). Developmental cigarette smoke exposure Liver proteome profile alteration. *Toxicology*, 300, 1–11.
- CARNEY, E. W., & FOOTE, R. H. (1991). Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 91(1), 113–123.
- RAMÍREZ, R. (2012). In utero fetal programming and its impact on health in adulthood. *Endocrinología y nutrición*, 58(8), 443–445.
- DODE, M. A. N., DUFORT, I., MASSICOTTE, L., & SIRARD, M. A. (2006). Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 73(3), 288–297.

- FISCHER, B., CHAVATTE-PALMER, P., VIEBAHN, C., SANTOS, A., & DURANTHON, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, *144*(1), 1–10.
- FLEMING, T. P., KWONG, W. Y., PORTER, R., URSELL, E., FESENKO, I., WILKINS, A., ECKERT, J. J. (2004). The embryo and its future. *Biology of Reproduction*, *71*(4), 1046–54.
- GARCÍA, M. L., & BASELGA, M. (2002). Estimation of correlated response on growth traits to selection in litter size of rabbits using a cryopreserved control population and genetic trends. *Livestock Production Science*, *78*(2), 91–98.
- HANSIS, C., TANG, Y. X., GRIFO, J. A., & KREY, L. C. (2001). Analysis of Oct-4 expression and ploidy in individual human blastomeres. *Molecular Human Reproduction*, *7*(2), 155–61.
- HARPER, M. J. K. (1960). The time of ovulation in the rabbit following the injection of luteinizing hormone. *J. Endocrin.* (1961), *22*, 147–152.
- HOCHER, B. (2014). More than genes: the advanced fetal programming hypothesis. *Journal of Reproductive Immunology*, *104-105*, 8–11.
- KANG, C., BRENNAN, J. A., KUZMIAK-GLANCY, S., GARROTT, K. E., KAY, M. W., & EFIMOV, I. R. (2016). Technical advances in studying cardiac electrophysiology - Role of rabbit models. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1–13.
- KHOSLA, S., DEAN, W., REIK, W., & FEIL, R. (2001). Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Human Reproduction Update*, *7*(4),
- KNISS DA, SHUBERT PJ, ZIMMERMANN PD, LANDON MB, GABBE SG, (1994). Insulin-like growth factors. Their regulation of glucose and amino acid transport in placental trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi. *J Biol Chem* *258*, 6561-6556.
- LAVARA, R., BASELGA, M., MARCO-JIMENEZ, F., & VICENTE, J. S. (2014). Long-term and transgenerational effects of cryopreservation on rabbit embryos. *Theriogenology*, *81*(7), 988–992.
- LAVARA, R., BASELGA, M., & VICENTE, J. S. (2011). Does storage time in LN2 influence survival and pregnancy outcome of vitrified rabbit embryos? *Theriogenology*, *76*(4), 652–657.
- LONERGAN, P., EVANS, A. C. O., BOLAND, E., RIZOS, D., FAIR, T., DUFFY, P., TIAN, X. C. (2007). Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos. *Theriogenology*, *68*(8), 1128–1137.
- MAHSOUDI, B., LI, A., & O'NEILL, C. (2007). Assessment of the long-term and transgenerational consequences of perturbing preimplantation embryo development in mice. *Biology of Reproduction*, *77*(5), 889–96.
- MAMO, S., GAL, A. B., POLGAR, Z., & DINNYES, A. (2008). Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5F1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology*, *9*, 67.
- MARCO-JIMÉNEZ, F., LAVARA, R., JIMÉNEZ-TRIGOS, E., & VICENTE, J. S. (2013). In vivo development of vitrified rabbit embryos: Effects of vitrification device, recipient genotype, and asynchrony. *Theriogenology*, *79*(7), 1124–1129.

- MCARDLE, A. M., DENTON, K. M., MADUWEGEDERA, D., MORITZ, K., FLOWER, R. L., & ROBERTS, C. T. (2009). Ontogeny of Placental Structural Development and Expression of the Renin-Angiotensin System and 11 β -HSD2 Genes in the Rabbit. *Placenta*, 30(7), 590–598.
- NICHOLS, J., ZEVIK, B., ANASTASSIADIS, K., NIWA, H., KLEWE-NEBENIUS, D., CHAMBERS, I., SMITH, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95, 379–391.
- REDONDO S,(2014). *Efecto de la vitrificación embrionaria sobre el proteoma de hígados de conejo*. Trabajo Final de Carrera. Universitat Politècnica de València. 58 pp
- OHLSSON, C., MOHAN, S., SJÖGREN, K., TIVESTEN, Å., ISGAARD, J., ISAKSSON, O., SVENSSON, J. (2009). The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocrine Reviews*, 30(5), 494–535.
- PARIA, B. C., & DEY, S. K. (1990). Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87(12), 4756–4760.
- PINBORG, A., WENNERHOLM, U. B., ROMUNDSTAD, L. B., LOFT, A., AITTO MAKI, K., SÖDERSTRÖM-ANTTILA, V., BERGH, C. (2013). Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 19(2), 87–104.
- SÁENZ-DE-JUANO, M.D. (2010). *Expresión génica en blastocistos preimplantacionales de conejo*. Trabajo Final de Carrera. Universitat Politècnica de València. 73 pp.
- SÁENZ-DE-JUANO, M.D. (Febrero, 2014). Study of the effect of cryopreservation on rabbit embryo gene expression. Tesis Doctoral en Ciencia Animal. Universitat Politècnica de València. 176 pp.
- SÁENZ-DE-JUANO, M.D.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; SCHMALTZ-PANNEAU, B.; JIMÉNEZ-TRIGOS, E.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; PEÑARANDA, D.S.; JOUINEAU, L.; LECARDONNEL, J.; LAVARA, R.; NATURIL ALFONSO, C.; DURANTHON, V.; VICENTE, J.S. (2014). Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. *Reproduction*, 147: 789-801
- SANTOS, A. N., RAMIN, N., TONACK, S., & FISCHER, B. (2008). Cell lineage-specific signaling of insulin and insulin-like growth factor I in rabbit blastocysts. *Endocrinology*, 149(2), 515–524.
- SANTOS, F., HYSLOP, L., STOJKOVIC, P., LEARY, C., MURDOCH, A., REIK, W., DEAN, W. (2010). Evaluation of epigenetic marks in human embryos derived from IVF and ICSI. *Human Reproduction*, 25(9), 2387–2395
- SHEN, L., LIU, Z., GONG, J., ZHANG, L., WANG, L., MAGDALOU, J., WANG, H. (2014). Prenatal ethanol exposure programs an increased susceptibility of non-alcoholic fatty liver disease in female adult offspring rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(2), 263–273.
- STOJANOV, T., & O'NEILL, C. (2001). In vitro fertilization causes epigenetic modifications to the onset of gene expression from the zygotic genome in mice. *Biology of Reproduction*, 64(2), 696–705.

- STROUD, L. R., PAPANDONATOS, G. D., RODRIGUEZ, D., MCCALLUM, M., SALISBURY, A. L., PHIPPS, M. G., MARSIT, C. J. (2014). Maternal smoking during pregnancy and infant stress response: Test of a prenatal programming hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*, *48*, 29–40.
- SULTANA, F., HATORI, M., SHIMOZAWA, N., EBISAWA, T., & SANKAI, T. (2009). Continuous observation of rabbit preimplantation embryos in vitro by using a culture device connected to a microscope. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, *48*(1), 52–6.
- SYMEON, G. K., GOLIOMYTIS, M., BIZELIS, I., PAPADOMICHELAKIS, G., PAGONOPOULOU, O., ABAS, Z., CHADIO, S. E. (2015). Effects of gestational maternal undernutrition on growth, carcass composition and meat quality of rabbit offspring. *PLoS ONE*, *10*(2), 1–11.
- TAMADA H, HIGASHIYAMA C, TAKANO H, KAWATE N, INABA T, SAWADA T, (1999). The effects of Heparin-Binding epidermal growth factor-like growth factor on preimplantation-embryo development and implantation in the rat. *Life Sci* *64*, 1967-1973.
- TELFORD, N. A., WATSON, A. J., & SCHULTZ, G. A. (1990). Review Article: Transition From Maternal to Embryonic Control in Early Mammalian Development : A Comparison of Several Species. *Mol. Reprod. Dev.*, *26*, 90–100.
- VICENTE, J. S., VIUDES-DE-CASTRO, M. P., & GARCÍA, M. L. (1999). In vivo survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein. *Reproduction, Nutrition, Development*, *39*(5-6), 657–62.
- WALKER, S. K., HARTWICH, K. M., & ROBINSON, J. S. (2000). Long-term effects on offspring of exposure of oocytes and embryos to chemical and physical agents. *Human Reproduction Update*, *6*(6), 564–77.
- WANG, Z., XU, L., & HE, F. (2010). Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. *Fertility and Sterility*, *93*(8), 2729–2733.
- WENDY E, H., REES, M., KILE, E., MATHEWS, J. D., & WANG, Z. (1999). A new dimension to the Barker hypothesis: Low birthweight and susceptibility to renal disease. *Kidney International*, *56*(3), 1072–1077.
- WU, Y. MENG, LUO, H. WEN, KOU, H., WEN, Y. XIAN, SHEN, L., PEI, L. GUO, WANG, H. (2015). Prenatal caffeine exposure induced a lower level of fetal blood leptin mainly via placental mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *289*(1), 109–116.
- YAN, Q., ZHANG, Q., YANG, H., ZOU, Q., TANG, C., FAN, N., & LAI, L. (2014). Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regeneration (London, England)*, *3*(1), 12.
- ZDRAVKOVIC, T., GENBACEV, O., MCMASTER, M. T., & FISHER, S. J. (2005). The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: A review. *Placenta*, *26*(SUPPL.).

ZHAO, X. M., DU, W. H., HAO, H. S., WANG, D., QIN, T., LIU, Y., & ZHU, H. BIN. (2012). Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, 79(7), 445–450.