

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



**Efecto de la hiperestimulación ovárica sobre la competencia
espermática.**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Curso académico: 2018/2019

Autor: **D. Jorge Martínez Fernández**

Tutor académico: **D. Francisco Marco Jiménez**

Valencia, Julio 2019



DATOS DEL TRABAJO

Alumno: D. Jorge Martínez Fernández

Tutor académico: D. Francisco Marco Jiménez

Valencia, Julio 2018

TÍTULO

Efecto de la hiperestimulación ovárica sobre la competencia espermática.

RESUMEN

La hiperestimulación ovárica es un tratamiento que se utiliza rutinariamente para optimizar el empleo de las técnicas de reproducción asistida, y consiste en someter a las hembras a una sobre exposición a hormonas gonadotropinas exógenas con el objetivo de incrementar su ratio de ovulación respecto al que ocurre en condiciones fisiológicas. Sin embargo, esta práctica no se encuentra exenta de controversia ya que su aplicación genera un ambiente endocrino uterino-oviductal alterado, que parece inducir modificaciones en los órganos reproductores femeninos que podrían generar alteraciones en el normal desarrollo de la ovulación, el transporte y selección de los espermatozoides que producirán la fecundación y el desarrollo embrionario temprano.

Por ello, los objetivos de este trabajo son evaluar el efecto del tratamiento de hiperestimulación ovárica mediante la hormona recombinante corifolitropina alfa sobre la competencia espermática y la paternidad de la descendencia obtenida tras la inseminación artificial con una mezcla heterospérmica y determinar el efecto que las modificaciones inducidas por este tipo de tratamientos producen sobre la calidad embrionaria mediante el estudio de la expresión génica de los genes de pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG en embriones preimplantacionales.

Los resultados obtenidos muestran que el ratio de recuperación de embriones preimplantacionales fue significativamente superior en las hembras sometidas al tratamiento de hiperestimulación, y que los genes SOX2 y NANOG estaban significativamente sobre expresados en estos embriones en comparación con los controles. Además, también se observó que este tipo de tratamientos modifica significativamente el patrón de paternidad observado tras la realización de una inseminación heterospérmica.

Por lo tanto, se puede concluir que los tratamientos de hiperestimulación ovárica con la hormona recombinante corifolitropina alfa estimulan la respuesta ovárica de la hembra produciendo un incremento en la masa ovárica, la tasa de ovulación y la tasa de recuperación en embriones de seis días. Sin embargo, este tipo de tratamientos parece afectar a la calidad de los embriones producidos, ya que estos exhiben un patrón diferencial de expresión de mRNA de los genes SOX2 y NANOG. Además, estos tratamientos afectan a la competencia espermática y alteran la paternidad de la descendencia obtenida tras la inseminación artificial con una mezcla heterospérmica.

PALABRAS CLAVE

Hiperestimulación ovárica, competencia espermática, fecundación, expresión génica, respuesta ovárica, inseminación heterospérmica, conejo

TITLE

Effect of ovarian hyperstimulation over spermatic competence.

SUMMARY

Ovarian hyperstimulation is a treatment which is routinely used to optimize the use of assisted reproduction techniques, and consists on subjecting the females to an overexposure to exogenous gonadotropin hormones in order to increase their ovulation rate compared to the one they exhibit under physiological conditions. However, this practice is not exempt from controversy, since its application generates an altered uterine-oviductal endocrine environment which seems to induce modifications in the female reproductive organs that could generate alterations in the normal development of ovulation, the transport and selection of the fertilizing spermatozoa and the early embryonic development.

Therefore, the objectives of this study are to evaluate the effect of the ovarian hyperstimulation treatment with recombinant hormone coriofollitropin alfa on sperm competition and offspring paternity after an artificial insemination using a heterospermic mixture, and to determine the effect that the induced modifications by this type of treatments produce on the embryonic quality through the study of the gene expression of the OCT4, SOX2 and NANOG pluripotency genes in preimplantational embryos.

The results obtained show that the recovery rate of preimplantational embryos was significantly higher in the females subjected to the hyperstimulation treatment, and that SOX2 and NANOG genes were significantly overexpressed in these embryos when compared to the controls. In addition, it was also observed that this type of treatment significantly modifies the observed paternity pattern after a heterospermic insemination.

Therefore, it can be concluded that ovarian hyperstimulation treatments with recombinant hormone coriofollitropin alfa effectively stimulate the ovarian response of the female, producing an increase in the total ovarian mass, the ovulation rate and the six-day embryo recovery rate. However, these treatments seem to affect the quality of the produced embryos, since they exhibit a differential pattern on the mRNA expression of SOX2 and NANOG genes. In addition, these treatments affect sperm competition and alter the paternity of the obtained offspring after an artificial insemination using a heterospermic mixture.

KEYWORDS

Ovarian hyperstimulation, sperm competition, fertilization, gene expression, ovarian response, heterospermic insemination, rabbit

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría utilizar este espacio para agradecer a todas las personas que han empleado su tiempo y esfuerzo en ayudarme y conseguir que este momento se hiciera realidad, pues sin su ayuda no hubiera sido posible.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a todos los miembros del departamento de reproducción animal, pues todos han puesto su granito de arena en la concepción, diseño y realización de este experimento. En especial a Paco, por sus consejos y su inestimable labor como tutor de este trabajo, a David, por estar siempre disponible y dedicar tiempo, incluso cuando no lo tenía, para solucionar cualquier inconveniente que surgiera durante la realización de los experimentos y a Amparo, por aportar un poco de organización en el laboratorio y estar siempre dispuesta a resolver todas las dudas con una sonrisa.

También me gustaría agradecer a todos los compañeros que han pasado estos meses conmigo en ese despacho de la 5º planta. Gracias Josep, Almudena, Belén, Zaida, David, Noelia, Paula y Laura por vuestra compañía y vuestros consejos. En especial quiero agradecer a Josep, Almudena y Belén por esas conversaciones que se interrumpían para hacer un vórtex y que hacían que las incubaciones pasaran un poquito más rápido, por esos días en los que nos salía todo mal y aun así conseguíais hacerme reír y, en definitiva, por convertirlos en mi nueva familia en el laboratorio.

Por último, también me gustaría agradecer a mi familia y amigos por su apoyo constante y por hacerme disfrutar cada día de estos cuatro años como si fuese a ser el último. Gracias por estar ahí para consolarme cuando algo no salía bien y para celebrarlo conmigo cuando lo conseguía. Gracias por los momentos que hemos compartido, por todo lo que me habéis enseñado y por hacerme mejorar un poquito cada día. En resumen, gracias por ser vosotros.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	IV

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Tratamiento de hiperestimulación ovárica	1
1.1.1. Efecto de la hiperestimulación ovárica sobre el transporte de espermatozoides	1
1.1.2. Efecto de la hiperestimulación ovárica sobre el desarrollo embrionario	3
1.1.3. Particularidades de la hiperestimulación ovárica en el modelo conejo	3
1.2. Inseminación heterospérmica	4
1.2.1. La inseminación heterospérmica como medida de la fertilidad masculina	5
1.3. Técnicas de análisis de paternidad	6
1.3.1. Estudio de diferencias fenotípicas	6
1.3.2. Estudio de marcadores de ADN	7
1.3.2.1. Análisis de los microsatélites	8
1.4. Conejo como modelo animal	8
1.4.1. Particularidades de la biología reproductiva en el conejo	9
1.4.2. Técnicas de manejo experimental del conejo	10
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Animales	12
3.2. Obtención de ADN purificado	13
3.2.1. Extracción de sangre y aislamiento de ADN de los parentales	13
3.2.2. Tratamiento de hiperestimulación ovárica	13
3.2.3. Realización de la inseminación heterospérmica	14
3.2.4. Perfusión de los oviductos y recuperación de los blastocistos	15
3.2.5. Purificación del ADN de la descendencia	17
3.3. Análisis de los microsatélites	17
3.3.1. Amplificación del ADN (PCR) y secuenciación de los microsatélites	17
3.3.2. Establecimiento de la paternidad de la descendencia	19
3.4. Evaluación de la expresión génica	20
3.4.1. Extracción del ARN y retrotranscripción a ADN	20
3.4.2. Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR)	21
3.5. Análisis estadístico	22
3.6. Diseño experimental del TFG	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Estudio de los parámetros seminales de los diferentes eyaculados	24
4.2. Estudio de la respuesta al tratamiento de hiperestimulación ovárica	24
4.3. Estudio del efecto del tratamiento sobre la competencia espermática	27
4.4. Estudio del efecto del tratamiento sobre la expresión génica embrionaria	29
5. DISCUSIÓN	30
6. CONCLUSIONES	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea en 2011, divididos por clases.....	8
Figura 2: Clasificación de Grosser sobre el tipo placentario basada en la relación entre el corión y la pared uterina.....	10
Figura 3: Imagen de un ejemplar de conejo perteneciente a una línea sintética seleccionada por una combinación de tamaño de camada y ganancia media diaria durante el engorde desde 1980	12
Figura 4: Imagen de la extracción de sangre de la arteria central de la oreja de un conejo	13
Figura 5: Imagen de la cámara cuenta glóbulos Thoma-Zeiss empleada para determinar la concentración espermática	15
Figura 6: Imagen de los blastocistos recuperados a los seis días en el medio de perfusión.....	16
Figura 7: Imagen de los ovarios recuperados de una hembra superovulada sacrificada donde se aprecian los cuerpos lúteos (marcados con una flecha), cuyo número determinó la tasa de ovulación	16
Figura 8: Imagen del secuenciador CEQ 8000 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) empleado durante la secuenciación de los microsátélites de interés	19
Figura 9: Ejemplo del patrón de picos observados tras hacer la secuenciación de microsátélites para el gen INRACDDV0157 en una muestra de ADN de una hembra superovulada	19
Figura 10: Imagen del programa informático CERVUS empleado para la asignación de paternidades	20
Figura 11: Diseño experimental del trabajo consistente en el estudio de los efectos que el tratamiento de hiperestimulación ovárica induce sobre la competencia espermática y la selección de la descendencia	23
Figura 12: Tasa de ovulación exhibida por las hembras superovuladas vs las hembras control. Columnas con diferente letra representan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$)	25
Figura 13: Tasa de recuperación de embriones de seis días exhibida por las hembras superovuladas vs las hembras control. Columnas con diferente letra representan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$)	25
Figura 14: Peso total de los ovarios recuperados de las hembras superovuladas vs las hembras control. Columnas con diferente letra representan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$)	26
Figura 15: Peso total de las hembras superovuladas vs las hembras control el día del sacrificio. Columnas con diferente letra representan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$)	26
Figura 16: Comparación del número de crías engendrado por cada uno de los cuatro posibles padres tras un tratamiento de hiperestimulación ovárica y tras un ciclo de ovulación natural. Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) para cada macho	28
Figura 17: Comparación del nivel de expresión génica de los genes OCT4, SOX2 y NANOG en embriones engendrados tras un ciclo de ovulación natural respecto de aquellos engendrados tras un tratamiento de hiperestimulación ovárica. Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) para cada uno de los genes	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de los cebadores empleados en la PCR, secuencia del cebador y tamaño del fragmento amplificado	17
Tabla 2: Programa de tiempos y temperaturas utilizadas en la PCR para los microsatélites INRACCDDV0137 y INRACCDDV0036	18
Tabla 3: Programa de tiempos y temperatura utilizadas en la PCR para los microsatélites INRACCDDV0157, INRACCDDV0087 y INRACCDDV0035	18
Tabla 4: Programa de tiempos y temperatura utilizadas en la preparación del cADN	21
Tabla 5: Características de los cebadores empleados en la qPCR, secuencia del cebador y tamaño del fragmento amplificado	21
Tabla 6: Programa de tiempos y temperatura utilizadas en la qPCR	22
Tabla 7: Análisis de los principales parámetros seminales para cada uno de los machos y su significación	24
Tabla 8: Genotipo de los machos cuyo semen se utilizó en la mezcla heterospérmica (parte superior) y de las hembras participantes en el estudio (parte inferior) para los microsatélites de interés	27

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

BHC: Frecuencia de batido de cabeza del espermatozoide

BSA: Bovine Serum Albumin (Albúmina de suero bovino)

cADN: Ácido desoxirribonucleico complementario

DPBS: Dulbecco's phosphate buffer saline (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco)

eCG: Hormona coriónica equina

FSH: Hormona folículo-estimulante

Fw: Forward primer (Cebador directo)

GnRH: Gonadotropin releasing hormone (hormona liberadora de gonadotropina)

H2AFZ: Gen H2A histone family member z

hCG: Hormona coriónica humana

IA: Inseminación artificial

IH: Inseminación heterospermica

ISAS: Sistema computerizado de medida de la motilidad espermática

LIN: Índice de linealidad del espermatozoide

LH: Hormona luteinizante

mARN: Ácido ribonucleico mensajero

micro ARN: Micro ácido ribonucleico

Nº: Número

NANOG: Gen homeobox NANOG

OCT4: Gen octamer-binding transcription factor 4

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PVP: Polivinilpirrolidona

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction (PCR cuantitativa a tiempo real)

RFLP: Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo de longitud de fragmento)

rFSH-CTP: Hormona corifolitropina-alfa folículo-estimulante recombinante

Rv: Reverse primer (Cebador indirecto)

SOX2: Gen sex determining region Y-box 2

SRT: índice de rectitud del espermatozoide

SSR: Simple sequence repeats (repeticiones de secuencia simple)

STR: Short tandem repeats (repeticiones de tándem corto)

Taq: Polimerasa extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*

tARN: Ácido ribonucleico de transferencia

TO: Tasa de ovulación

TR: Tasa de recuperación de embriones

TRA: Técnicas de reproducción asistida

VAP: Velocidad media del recorrido del espermatozoide

VCL: Velocidad curvilínea del espermatozoide

VSL: Velocidad rectilínea del espermatozoide

VNTR: Variable number tandem repeats. (repeticiones tándem de número variable)

(V/W): Volumen administrado por cada kg de peso del animal

WOB: Índice de oscilación del espermatozoide

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tratamiento de hiperestimulación ovárica

La hiperestimulación ovárica o superovulación es un tratamiento mediante el cual se somete a las hembras a una sobre exposición a hormonas gonadotropinas exógenas con el objetivo de incrementar su ratio de ovulación respecto al que ocurre en condiciones fisiológicas (POLLARD *et al.*, 2007). Generalmente este tratamiento se utiliza para optimizar el empleo de las técnicas de reproducción asistida (TRA) ya que posibilita la obtención de un mayor número de ovocitos y con ello se incrementa la producción de embriones por animal, con lo que se reduce el número de tratamientos a realizar a cada uno de ellos (CORTELL *et al.*, 2010; GAD *et al.*, 2011; ORTEGA *et al.*, 2018). Sin embargo, esta práctica no se encuentra exenta de controversia ya que su aplicación genera un ambiente endocrino uterino-oviductal alterado, que según diferentes estudios parece inducir modificaciones en los órganos reproductores femeninos que podrían generar alteraciones en el normal desarrollo de la ovulación y el embarazo (GREVE y CALLESEN, 2001; GAD *et al.*, 2011). En este sentido, se ha demostrado que los protocolos de hiperestimulación ovárica inducen alteraciones en el microambiente del útero y el oviducto, incrementando el riesgo de producir embarazos ectópicos (LONDRA *et al.*, 2016). Además, se ha observado que las hormonas gonadotropinas interactúan con las células de la superficie del ovario induciéndolas a proliferar e inmortalizarse y por tanto aumentando el riesgo de que se desarrolle un carcinoma de ovario (KONISHI, 2006). En vacuno, también se ha descrito la aparición de alteraciones en el desarrollo folicular, la maduración de los ovocitos, la ovulación y el transporte de espermatozoides (KAFI y MCGOWAN, 1997; GREVE y CALLESEN, 2001). Además, el tratamiento de hiperestimulación ovárica no produce el mismo efecto en todos los pacientes ya que existen diferentes factores como la edad, el estatus nutricional o la salud que interactúan con estos tratamientos (BEHRINGER *et al.*, 2018). Así, las hembras jóvenes que han alcanzado la madurez sexual generan una mayor respuesta, obteniéndose un mayor número de ovocitos en comparación con las hembras de mayor edad, mientras que aquellas hembras enfermas o malnutridas responderán pobremente a los tratamientos de superovulación, produciendo menos ovocitos tras los mismos (LANG and LAMOND, 1966; BEHRINGER *et al.*, 2018). Además, la respuesta de los diferentes animales a la inyección de hormonas gonadotropinas exógenas también depende del número y la frecuencia con la que se administran estos tratamientos. De este modo, la respuesta ovulatoria de un animal se reduce tras tratamientos de hiperestimulación ovárica consecutivos (MEHAISEN *et al.*, 2006; CORTELL *et al.*, 2010), como consecuencia de la producción de anticuerpos anti-gonadotropinas (DRION *et al.*, 2001; HALLER *et al.*, 2005).

1.1.1 Efecto de la hiperestimulación ovárica sobre el transporte de espermatozoides

Durante la inseminación los espermatozoides son depositados en la vagina de la hembra, desde donde ascenderán a través del útero y el oviducto hasta la zona ampulla-istmo, lugar donde se produce la fecundación del ovocito y al que únicamente llega una pequeña cantidad de los mismos (WILLIAMS *et al.*, 1992; HOLT y FAZELI, 2015; GARCIA-VAZQUEZ *et al.*, 2016). La progresión de los espermatozoides a través del *mucus* cervical depende principalmente del espacio intersticial entre micelas de mucina (CHRETIEN, 1989), y este espacio está determinado por la cantidad y concentración del *mucus* segregado, variables que, a su vez, están reguladas por factores hormonales (SHARIF y OLUFWABI, 2006). Durante este transporte, los espermatozoides deben ser seleccionados y capacitados gracias a su interacción con las moléculas presentes en el fluido uterino-oviductal, cuya composición está regulada por las secreciones de las células epiteliales (CHAN *et al.*, 2007). Es por ello que cualquier modificación de la composición del medio uterino-oviductal puede inducir una alteración de los mecanismos de selección y

capacitación de los espermatozoides transportados. Además, se ha demostrado que la exposición a diversos factores ambientales como las aflatoxinas fúngicas puede afectar a la capacidad de fecundación de los espermatozoides, no solo mediante la interferencia con el normal desarrollo de la espermatogénesis sino a través de la fragmentación de su ADN en el tracto reproductivo de la hembra (KOMSKI-ELBAZ *et al.*, 2018). Esta observación permite suponer que las diferencias de fertilidad de cada macho podrían no ser debidas únicamente a diferencias en la capacidad fecundante característica de cada uno de ellos, sino que estarían influenciadas por el grado de adaptación de los eyaculados a las modificaciones producidas por los factores ambientales existentes en el interior del tracto reproductor femenino (GREVE y CALLESEN, 2001). Así, la capacidad fecundante de cada eyaculado podría verse modificada al cambiar las condiciones del medio en el que progresan. Entre dichos factores ambientales se encontraría el pH, que juega un papel fundamental en la regulación de la motilidad y la viabilidad espermáticas. Durante su estancia en el aparato reproductor de la hembra los espermatozoides deben enfrentarse a fluctuaciones en los valores del pH y la concentración de iones que pueden afectar a su capacidad de fecundación del ovocito (MISHRA *et al.*, 2018). Es por ello que los espermatozoides han desarrollado sistemas dinámicos de regulación del pH intracelular (DARSZON *et al.*, 1999). Por lo tanto, parte de las diferencias en la capacidad fecundante observadas entre machos al realizar una inseminación heterospérmica (IH) podrían estar explicadas por diferencias en la eficiencia de los sistemas de regulación del pH intracelular exhibidos por los espermatozoides de cada eyaculado.

Como se ha comentado anteriormente, el aparato reproductor femenino de los mamíferos interactúa física y molecularmente con los espermatozoides para mantener su viabilidad, facilitar su migración hasta encontrarse con el óvulo y seleccionar a aquellos que realizarán la fecundación (HOLT y FAZELI, 2015; SUAREZ, 2015; GARCIA-VAZQUEZ *et al.*, 2016). Ejemplo de ello son las células epiteliales de la unión útero-tubárica, encargadas de regular la entrada de los espermatozoides en el oviducto mediante la interacción directa con estos (PACEY *et al.*, 1995). Siguiendo esta línea de investigación, son diversos los estudios en ratones que demuestran que una morfología y motilidad normales de los espermatozoides no son suficientes, sino que la interacción específica entre algunas proteínas de la membrana de los espermatozoides y las células del epitelio de la unión uterotubárica es imprescindible para que el espermatozoide pueda acceder al oviducto (NAKASHINI *et al.*, 2004; OKABE, 2015). En humanos, se ha observado que tanto el ovocito como las células del cúmulo segregan sustancias químico atrayentes para los espermatozoides con el objetivo de guiarlos hacia el ampolla e inducir la fecundación (SUN *et al.*, 2005). En base a toda esta información, la pregunta que nos planteamos es si los tratamientos de hiperestimulación ovárica producen modificaciones en el aparato reproductor de la hembra que puedan modificar el patrón de la selección de los espermatozoides que llegan a la zona de fecundación. En este sentido algunos autores afirman que el ambiente endocrino del medio uterino-oviductal presenta una influencia decisiva en la capacitación y el transporte de los espermatozoides a través del istmo mediante la regulación indirecta de los gradientes de calcio por parte de la progesterona presente en el fluido folicular (HUNTER *et al.*, 1999; GREVE y CALLESEN, 2001). Otros estudios recientes, en ovino, han demostrado que la hiperestimulación produce modificaciones en la formación y composición del moco vaginal que se han relacionado con un deficiente transporte de espermatozoides y una disminución de la fertilidad (MADDISON *et al.*, 2017). En humanos, son varios los estudios que han demostrado que el patrón de expresión de proteínas en las secreciones endometriales varía significativamente entre hembras sometidas a un tratamiento de hiperestimulación ovárica controlada respecto de aquellos observados en pacientes que seguían ciclos naturales (BOOMSMA *et al.*, 2009; 2010) y además, PEREZ-RUIZ *et al.*, (2018) han demostrado la existencia de modificaciones en los niveles de glicosilación proteica del fluido folicular ocasionadas por este tipo de tratamientos.

1.1.2 Efecto de la hiperestimulación ovárica sobre el desarrollo embrionario

Uno de los principales problemas atribuibles al uso de los tratamientos de hiperestimulación ovárica es el efecto variable que pueden presentar sobre la respuesta ovárica, el ratio de fecundación y el normal desarrollo de los embriones (VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2009). En este sentido, algunos estudios han demostrado que el tratamiento de hiperestimulación ovárica produce un retraso en el desarrollo embrionario preimplantacional *in vivo* (VAN DER AUWERA, 2001). Otros autores han observado que la hiperestimulación podría afectar al correcto desarrollo de los embriones al inducir la formación de anomalías y la muerte embrionaria (PARVEX, 1982; ERTZEID y STORENG, 1992; GAD *et al.*, 2011; VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2017; 2019). Estas modificaciones podrían ser explicadas por diferentes factores como una reducción en la calidad ovocitaria, la creación de un microambiente uterino-oviductal hostil para el desarrollo embrionario (VAN DER AUWERA *et al.*, 1999), la inducción de una reducción en la receptividad exhibida por el endometrio (WALTON *et al.*, 1982), la escasez nutricional en el medio debido al exceso de embriones en el oviducto (EVANS *et al.*, 1981) o la combinación de estos. Además, se ha observado que los embriones que se desarrollan en el medio uterino-oviductal de hembras que han sido sometidas a un tratamiento de hiperestimulación ovárica exhiben diferencias en los niveles de expresión génica respecto de aquellos que se desarrollan en el medio uterino-oviductal de hembras que siguieron ciclos de ovulación naturales (GAD *et al.*, 2011). Según estos autores el tratamiento de hiperestimulación ovárica induce un aumento en la actividad embrionaria y los niveles de expresión génica que se corresponderían con una reducción en la calidad embrionaria y la viabilidad del embrión de acuerdo a la hipótesis del embrión tranquilo. Esta hipótesis propuesta por LEESE en 2002 afirma que los embriones viables muestran un metabolismo más lento que aquellos que presentan una viabilidad menor. Este menor metabolismo se correspondería con el nivel de actividad basal necesario para el mantenimiento de los procesos de desarrollo normales y se perdería en respuesta al estrés ambiental, produciendo daños celulares que pueden comprometer el desarrollo y la viabilidad del embrión (LEESE *et al.*, 2007; 2008). Por otro lado, se ha observado en ratones como la superovulación produce modificaciones en las marcas epigenéticas en genes de origen tanto materno como paterno (MARKET-VELKER *et al.*, 2010). Este fenómeno podría deberse a un efecto dual de la hiperestimulación ovárica donde se modifica la formación del patrón epigenético de los ovocitos en desarrollo y, al mismo tiempo, se altera la producción de los productos génicos maternos necesarios para el mantenimiento del patrón epigenético del embrión antes de la implantación. Estos productos génicos maternos cuya modificación induce alteraciones en los patrones de metilación podrían ser ADN metiltransferasas, ya que se han observado alteraciones en los niveles de expresión de proteínas metiltransferasas durante los tratamientos de superovulación (UYSAL *et al.*, 2017). Además, estudios recientes han descubierto que existen al menos 14 micro ARNs diferencialmente expresados en las células de la granulosa y se relacionan con la capacidad del ovocito fecundado de proseguir su desarrollo y alcanzar la etapa de blastocito (O'DOHERTY *et al.*, 2018).

1.1.3. Particularidades de la hiperestimulación ovárica en el modelo conejo

En el modelo conejo los tratamientos de hiperestimulación ovárica se han llevado a cabo tradicionalmente mediante la adición de diferentes hormonas exógenas como la gonadotropina coriónica equina (eCG) o la hormona folículo-estimulante (FSH) (KAUFFMAN *et al.*, 1998). Sin embargo, la eficiencia de recuperación de los ovocitos proporcionada por estos dos procedimientos es muy variable, en parte debido a las grandes diferencias en la fármaco cinética de ambos compuestos (CORTELL *et al.*, 2014). De este modo mientras que una única inyección de eCG es suficiente para inducir una hiperestimulación, la FSH debe ser administrada al menos dos veces al día durante tres días debido a su menor vida media en sangre (ROSE *et al.*, 2000).

Cabe destacar que cuando se usa FSH extraída de la glándula pituitaria el ratio entre la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH) es desconocido, lo que puede conducir a la observación de variabilidad en la respuesta de las diferentes hembras al tratamiento de superovulación (CORTELL *et al.*, 2014). Sin embargo, el rol que la gonadotropina LH presenta durante el crecimiento de los folículos ováricos y la inducción de la ovulación no está claro (SALVETTI *et al.*, 2007) ya que algunos experimentos determinaron que el incremento de la proporción de LH frente al FSH está asociada a la disminución del ratio de fecundación y al incremento del número de embriones que sufren degeneración (DONALDSON y WARD, 1986) mientras que otros sostienen que la reducción en la proporción de LH utilizada frente al FSH se corresponde con una disminución de la cantidad de embriones recuperados por cada hembra, a pesar de que la calidad de los mismos se ve incrementada (BECKERS 1987). Recientemente este problema ha sido solucionado gracias a la irrupción de la hormona FSH recombinante. Esta hormona producida sintéticamente a partir de ADN recombinante no contiene contaminación de LH y se ha observado que induce la superovulación en un porcentaje similar al obtenido por la FSH sintetizada en la glándula pituitaria y mejora la calidad de los embriones producidos (WILSON *et al.*, 1993; VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2009).

Tradicionalmente los protocolos de superovulación en conejos se han realizado mediante la inyección múltiple, seis inyecciones espaciadas temporalmente, de hormona folículo-estimulante (FSH) exógena (KENNELLY y FOOTE, 1965) debido a que el uso de la hormona eCG se ha relacionado con la producción de anomalías cromosómicas en los embriones durante el estadio de blastocistos (FUJIMOTO *et al.*, 1974) y la inducción de alteraciones en el transporte de óvulos en el tracto genital de las hembras (ADAMS, 1965). Sin embargo estos métodos requieren del consumo de una gran cantidad de trabajo y tiempo y suponen un considerable estrés de los animales en estudio por lo que, en los últimos tiempos, se ha incrementado el interés por el estudio de métodos que conlleven una sola intervención en los conejos como la implantación subcutánea de una bomba liberadora de FSH (TRELOAR *et al.*, 1997), la inyección única de una solución de FSH disuelta en polivinilpirrolidona (PVP) (KANAYAMA *et al.*, 1994), la inyección única de una solución de FSH y un gel compuesto por hidróxido de aluminio (HASHIMOTO *et al.*, 2007) o la inyección única de una solución de FSH recombinante unida a una hormona corifolitropina alfa de liberación prolongada (rFSH-CTP) (DEVROEY *et al.*, 2004; VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2009; 2017; 2019; VICENTE *et al.*, 2018).

1.2. La inseminación heterospérmica

Una vía empleada para el estudio del efecto que tienen los tratamientos de hiperestimulación ovárica en el interior del tracto reproductivo de la hembra ha sido el uso de la inseminación con mezclas heterospérmicas, que permiten distinguir la identidad del espermatozoide seleccionado para la fecundación (CORTELL *et al.*, 2010). La IH se define como el proceso mediante el cual espermatozoides procedentes de dos o más machos se encuentran presentes en el aparato reproductor de la hembra en el momento de la fecundación (DZIUK, 1996). Por lo tanto, el óvulo podría ser fecundado por un espermatozoide proveniente de cualquiera de los machos, estableciéndose de este modo una competencia entre los espermatozoides de distintos eyaculados en el tracto reproductivo de la hembra. Es posible observar este fenómeno en la naturaleza puesto que en diversas especies la hembra copula con distintos machos durante su período de celo para reducir el riesgo de que un macho sea infértil o no produzca suficientes gametos funcionales para fecundar todos los óvulos de la hembra (DAVIES *et al.*, 2012) o para aumentar la viabilidad de la descendencia al disminuir el riesgo de que sea fecundada por machos genéticamente inferiores (BELLAMY y PONIATOWSKY, 2011). Además, en algunas especies como en *Drosophila melanogaster*, la hembra incluso posee en su aparato reproductor cavidades que funcionan como receptáculos de almacenamiento de espermatozoides. El almacenamiento de espermatozoides en estas cavidades permite a la hembra utilizar espermatozoides de diferentes machos, así como separar física

y temporalmente la cópula de la fecundación (SCHNAKENBERG *et al*, 2012). Los espermatozoides serán liberados de los receptáculos una vez que se produzca la ovulación, de forma que se puedan acompañar los procesos de maduración del ovocito y de capacitación de los espermatozoides y de este modo se incremente la probabilidad de fecundación.

Sin embargo, los espermatozoides provenientes de distintos machos pueden no presentar la misma capacidad fecundante, lo que podría dar lugar a la observación de dominancias de unos machos sobre otros. Entre los principales factores que pueden afectar a las probabilidades de cada eyaculado para fecundar el ovocito se puede encontrar (i) -el tiempo transcurrido desde la inseminación hasta que se produce la fecundación, (ii) -el tiempo que necesita cada eyaculado para capacitarse, (iii) -el volumen y las características seminales de cada eyaculado o (iv) -el tiempo de vida medio de los espermatozoides de cada eyaculado. BERGER y DALLY (2001) estudiaron en ovino el efecto de la interacción macho-hembra producida en gestaciones anteriores y concluyeron que estas no afectan a la capacidad fecundante relativa de un eyaculado. La probabilidad relativa de que el ovocito sea fecundado por espermatozoides provenientes del eyaculado de un animal u otro también es dependiente de la propia capacidad fecundante relativa de cada macho, lo que se ha podido comprobar en diferentes estudios en los que se han inseminado hembras con mezclas heterospérmicas con la misma concentración y volumen de eyaculados de distintos machos con parámetros seminales similares, observando diferencias en la proporción de descendencia engendrada por cada macho (BEATTY, 1960; DZIUK, 1996; VICENTE *et al.*, 2004). Esto ha sido posible debido a que en los últimos años ha aumentado el interés por el estudio de los efectos de la IH puesto que desde mediados del siglo pasado esta se utiliza habitualmente para la producción comercial de algunas especies animales ya que produce un aumento en las ratios de concepción de las hembras (BEATTY, 1960).

1.2.1. La inseminación heterospérmica como medida de la capacidad fecundante masculina

La capacidad fecundante masculina se ha evaluado tradicionalmente mediante el estudio de la descendencia producida por cada macho tras una inseminación homospérmica que solo contenía semen procedente de un único macho (ROBL y DZIUK, 1988). La cuantificación del número de crías, la proporción de óvulos fecundados, la proporción de hembras inseminadas que han quedado gestantes o que no han regresado al ciclo estral producidas tras la inseminación homospérmica han sido los parámetros más estudiados para clasificar a los diferentes machos en función de su capacidad fecundante y por tanto para determinar el valor económico de sus eyaculados. Pero el uso de la inseminación competitiva o IH también ha sido empleado como método de análisis de la capacidad fecundante masculina (BEATTY, 1960; NAPIER, 1961; BEATTY *et al*, 1969; DZIUK, 1996). Así, mediante el estudio de las diferencias en la capacidad fecundante de diversos machos con características seminales similares, la IH nos permite determinar las dominancias biológicas basadas en el tratamiento, conservación y supervivencia de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de las hembras (VICENTE *et al.*, 2004).

A diferencia de los test clásicos de determinación de fertilidad masculina que están basados en las ratios de concepción, la tasa de parto y el tamaño de la camada, obtenidos mediante la inseminación homospérmica, la IH presenta un análisis de la capacidad fecundante masculina más objetivo y preciso ya que permite una competición entre espermatozoides en la misma hembra al mismo tiempo, lo que reduce la variación en la fecundación producida por el uso de diferentes hembras, la estación del año, y las técnicas de manejo de los animales (DZIUK, 1996). Por este motivo, el porcentaje de descendencia producida por cada macho tras someter una hembra a una IH con una mezcla de eyaculados que presentasen parámetros seminales similares, puede considerarse un método muy eficiente de selección de los machos según su capacidad fecundante (NAPIER, 1961). De hecho, BEATTY *et al.*, (1969) determinaron que la IH era hasta 170 veces más

precisa determinando las diferencias en la capacidad fecundante de los machos que la inseminación homospérmica. El incremento en las diferencias en la fecundación observadas entre dos eyaculados al utilizar la IH en lugar de la inseminación homospérmica podrían deberse a que la inseminación homospérmica se basa en el análisis de la proporción de óvulos fecundados por cada eyaculado, mientras que la IH ofrece un estudio de la proporción de óvulos fecundados por unidad de tiempo para cada eyaculado (ROBL y DZIUK, 1988). Esta hipótesis propone que una de las posibles causas de la dominancia entre eyaculados observada tras la práctica de la IH sería la velocidad específica para recorrer el aparato reproductor de la hembra y para penetrar la zona pelúcida del óvulo exhibida por cada uno de estos eyaculados. De este modo las diferencias en la fecundación observadas en la inseminación homospérmica serían menores puesto que al disponer de un tiempo ilimitado incluso los eyaculados más lentos son capaces de situar suficientes espermatozoides en el ampulla para producir elevados ratios de fecundación (ROBL y DZIUK, 1988). Sin embargo, esta hipótesis no podría explicar la totalidad de las diferencias en la capacidad fecundante observadas entre la inseminación homospérmica y la IH (ROBL y DZIUK, 1988) ni el incremento en los ratios de concepción producido por la utilización de la IH (BEATTY, 1960).

1.3. Técnicas de análisis de paternidad

Para poder establecer la existencia y naturaleza de las posibles modificaciones en la competencia espermática ocasionadas por los tratamientos de hiperestimulación ovárica es imprescindible realizar un estudio de la dominancia observable entre eyaculados procedentes de distintos machos en ambas condiciones, y para ello es necesario realizar un análisis de la paternidad de la descendencia concebida en cada una de las situaciones del estudio. Este tipo de análisis son cruciales para el estudio de la capacidad fecundante relativa de cada macho empleado, así como para establecer y comprender los mecanismos moleculares que determinan la dominancia entre eyaculados en el aparato reproductor de la hembra (VICENTE *et al.*, 2004). Pero el empleo de la inseminación heterospérmica depende completamente de la existencia de métodos que permitan la determinación de la paternidad de manera confiable y eficiente (STAHLBERG *et al.*, 2000).

1.3.1. Estudio de diferencias fenotípicas

Tradicionalmente la técnica de análisis de paternidad más utilizada ha sido el análisis visual de diferencias fenotípicas en las crías recién nacidas, pero este método presenta evidentes limitaciones ya que para poder realizar este tipo de estudios se requiere que los machos cuyo eyaculado se vaya a utilizar sean seleccionados de modo que presenten características fenotípicas claras y heredables con el objetivo de que su descendencia pueda ser identificada inequívocamente (VICENTE *et al.*, 2004). Generalmente los estudios que recurren al análisis de las diferencias fenotípicas para determinar la paternidad de la descendencia tras la inseminación heterospérmica utilizan semen procedente de machos que presentan pelajes con una coloración diferenciada (O'REILLY *et al.*, 1972). Estos requisitos dificultan la realización de inseminaciones heterospérmicas que contengan eyaculados de un elevado número de machos diferentes y el estudio de los mecanismos moleculares que rigen la dominancia entre eyaculados de conejos fenotípicamente similares. Otro inconveniente que presenta el estudio de las diferencias fenotípicas de la descendencia es la elevada cantidad de tiempo que requiere puesto que para poder emplear esta técnica es necesario esperar la totalidad del período de gestación de la hembra (STAHLBERG *et al.*, 2000).

Otra técnica que se ha empleado con éxito para determinar la paternidad de la descendencia tras una inseminación heterospérmica, es el empleo de eyaculados cuyos espermatozoides hayan sido marcados con fluorocromos (PARRISH y FOOTE, 1985). Esta técnica permite estudiar el número de espermatozoides y su transporte en el tracto reproductivo de la

hembra, el tiempo de capacitación y el ratio de penetración del ovocito característicos de cada eyaculado mediante la identificación del macho del que proceden los espermatozoides que han logrado producir la fecundación, así como también aquellos que han conseguido llegar al ampulla pero no han logrado fecundar el óvulo. Sin embargo, el marcaje de espermatozoides con fluorocromos también presenta inconvenientes, así como ciertos requisitos que han de satisfacerse para que pueda realizarse con éxito. Esta técnica es costosa, requiere que los fluorocromos que se emplean para el marcaje tengan una afinidad similar para los espermatozoides de los diferentes eyaculados y no tiene en cuenta la viabilidad de los embriones generados para la determinación de la capacidad fecundante de cada macho (STAHLBERG *et al.*, 2000).

Todas las razones previamente comentadas junto con el descubrimiento de los microsatélites gracias a los recientes avances en los campos de la biología molecular y la genética han propiciado que en los últimos tiempos los análisis de paternidad se estén realizando preferentemente mediante diferentes técnicas que implican el estudio de ciertos marcadores específicos de ADN (VICENTE *et al.*, 2004).

1.3.2. Estudio de marcadores de ADN

Los avances en la identificación de los diferentes marcadores de ADN y la caracterización de su polimorfismo en diversas especies han posibilitado la realización de test de paternidad sobre la descendencia obtenida tras una inseminación heterospérmica en la que se utilicen eyaculados procedentes de machos morfológicamente similares (VICENTE *et al.*, 2004). La determinación de la paternidad mediante el estudio de los marcadores de ADN presenta algunas ventajas frente a los métodos de estudio de diferencias fenotípicas que se empleaban anteriormente. Entre las ventajas que exhibe el estudio de los marcadores de ADN se pueden destacar el elevado número de marcadores de ADN altamente variables, lo que permite la determinación de la paternidad incluso si se realiza un cruce entre individuos genéticamente similares (STAHLBERG *et al.*, 2000), así como la flexibilidad que permite el uso de esta técnica pues se puede aplicar en cualquier etapa del desarrollo tras la fecundación (ZEVEREN *et al.*, 1995). Esto último posibilita un acortamiento de los tiempos necesarios para la determinación de la paternidad puesto que elimina la necesidad de esperar hasta que el embarazo llegue a término.

Actualmente existen una gran cantidad de marcadores de ADN diferentes que nos permiten determinar la ascendencia de un individuo concreto (HUFFEL y ROUGER, 1999). Entre estos marcadores podemos encontrar los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), los VNTR (Variable Tandem Number Repeats), los minisatélites o los microsatélites. Sin embargo, no todos ellos presentan las mismas características ni proporcionan los mismos intervalos de confianza para la determinación de la ascendencia de un individuo (USHA *et al.*, 2009). Generalmente los RFLP presentan baja heterocigosidad y proporcionan poca información sobre el grado de polimorfismo (BOTSTEIN *et al.*, 1980). Por otro lado, el análisis de los minisatélites es difícil de realizar y de reproducir debido a la extraordinaria variabilidad y polimorfismo que presentan (JEFFREYS *et al.*, 1991). En cambio, los microsatélites presentan un mayor polimorfismo que los RFLP, pero al estar localizados en *loci* específicos su análisis es menos complejo y más reproducible que el de los minisatélites (USHA *et al.*, 2009). Por todo ello el análisis de los microsatélites se ha convertido en una de las herramientas más empleadas para la determinación de la paternidad en diferentes especies (DONOGHUE *et al.*, 1999; STAHLBERG *et al.*, 2000; VICENTE *et al.*, 2004).

1.3.2.1. Análisis de los microsatélites

Los microsatélites conocidos como SSR (simple sequence repeats) o STR (short tandem repeats) son secuencias específicas de ADN consistentes en la repetición en tándem de unidades formadas por entre uno y seis nucleótidos (REMYA *et al.*, 2010). Estas secuencias presentan una alta variabilidad entre individuos de la misma población y su polimorfismo radica en las diferencias en el número de repeticiones de las unidades de nucleótidos (USHA *et al.*, 2009). Además, al presentar una longitud de entre 100 y 300 pares de bases, los microsatélites pueden amplificarse mediante una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) por lo que es posible determinar la paternidad de un individuo mediante el análisis de los microsatélites incluso aunque se disponga de muestras que presentes muy poca cantidad de ADN como es el caso de los blastocistos (SAIKI *et al.*, 1988). En conejo, el análisis de los microsatélites se ha convertido en la principal herramienta para el estudio de la genética de poblaciones molecular, cuyo objetivo es investigar la evolución e interacciones de las estructuras sociales y genéticas de las poblaciones silvestres (RICO *et al.*, 1994; SURRIDGE *et al.*, 1997; MOUGEL *et al.*, 1997; QUENEY *et al.*, 2001). Además, actualmente se han identificado y localizado más de 20 *loci* cuyos microsatélites presentan una elevada variabilidad en las poblaciones de *Oryctolagus cuniculus*, aunque cabe destacar que el polimorfismo observado en las poblaciones silvestres para estos microsatélites es mayor que aquel observado en las poblaciones domésticas (BOLET *et al.*, 2000).

1.4. Conejo como modelo animal

El conejo común o europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es la tercera especie más utilizada como modelo animal en la Unión Europea (3,12% de todos los ensayos experimentales de este territorio), tras ratas (13,9%) y ratones (60,9%), siendo su principal uso la producción de anticuerpos (EUROPEAN UNION, 2013) (Figura 1).

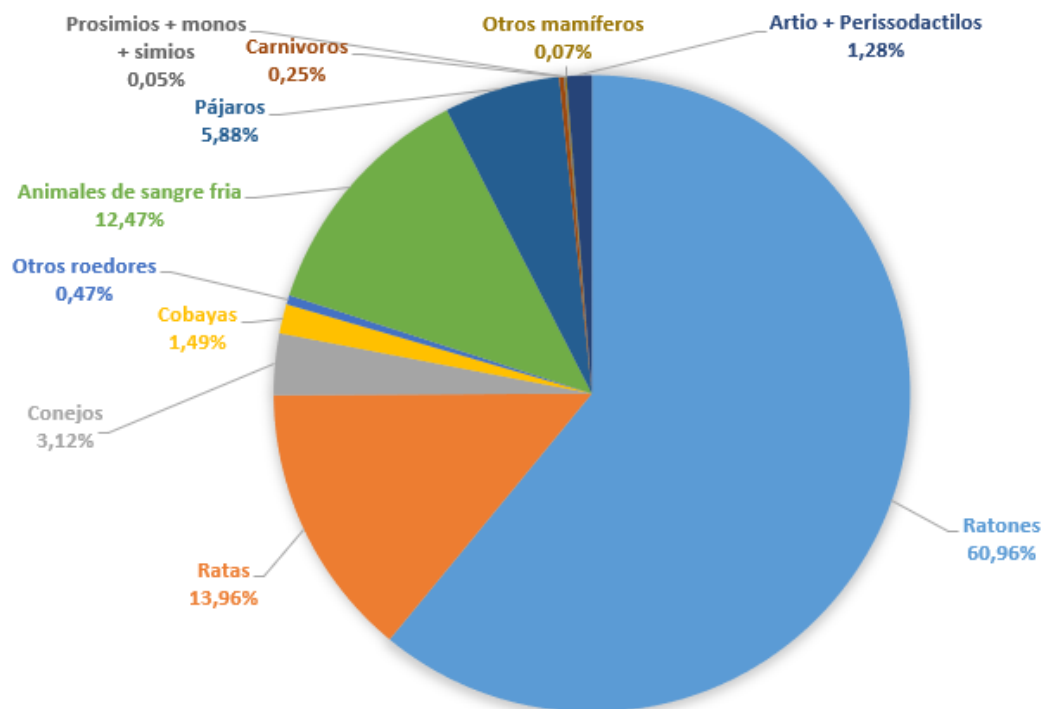


Figura 1: Porcentaje de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea en 2011, divididos por clases (Adaptado de EUROPEAN UNION, 2013).

Como puede apreciarse en la figura 1 el modelo animal más utilizado en la actividad experimental actual es el ratón. Esto es debido, principalmente, a que presenta un ciclo reproductivo muy corto y un tamaño corporal menor que otros modelos animales, por lo que su coste de alimentación y almacenaje es menor (PUSCHEL *et al.*, 2010). Además, en los últimos años el aislamiento de células embrionarias de ratón ha incrementado la información molecular disponible de esta especie, facilitando su manipulación genética e impulsando su uso en estudios de biología reproductiva y del desarrollo (FISHER *et al.*, 2012). Sin embargo, la utilización del ratón como modelo animal no permite llevar a cabo los procesos de recuperación de semen *in vivo* por lo que no resulta un animal adecuado para su uso en un experimento que requiera realizar inseminaciones de una mezcla heterospermica en un elevado número de hembras como es el caso de nuestro estudio. Por ello es necesario buscar un modelo animal diferente, como el conejo, que subsane estas inconveniencias y presente una serie de ventajas que permitan realizar el trabajo experimental de la manera más precisa y eficiente. Entre las principales ventajas que posibilitan la utilización del conejo como modelo animal se puede encontrar la gran similitud que presentan su genoma y las secuencias de los genes humanos, siendo esta similitud incluso superior a aquella que presentan los genomas de los roedores (GRAUR *et al.*, 1996), así como otros factores como su fácil manejo, docilidad, rápido ciclo vital y bajo coste de alimentación y estabulación (MAPARA *et al.*, 2012). También presentan una serie de ventajas específicas en el campo de la biología reproductiva como una ovulación inducida por el apareamiento que posibilita conocer exactamente la edad de los embriones e incrementa las probabilidades de que se produzca la fecundación y la gestación, un elevado rendimiento en el número de embriones que consiguen llegar a blastocistos, una implantación que se produce una vez que la gastrulación ya ha comenzado y una placenta hemocorial con características similares a aquellas que se desarrollan en humanos (FISHER *et al.*, 2012). Por todos estos motivos el conejo ha sido tradicionalmente el principal animal modelo utilizado en embriología y biología reproductiva y es el modelo seleccionado para la realización de este trabajo.

1.4.1. Biología reproductiva en el conejo

El conejo no exhibe un ciclo estral regular, sino que presenta un ciclo de ovulación inducida. Este fenómeno es posible debido a que la excitación sexual induce la liberación de FSH provocando la ovulación diez horas después de la cópula (BREWER, 2006). De este modo se incrementa la probabilidad de que se produzca la fecundación en el ámpula. Los óvulos de conejo son los que presentan un mayor tamaño (160 μm) y un desarrollo más veloz de entre todos los mamíferos, y se liberarán al interior del útero cuatro días después de la cópula (ADAMS, 1970). Para que se produzca una correcta implantación de los embriones en el útero de la coneja estos deben de estar recubiertos de una capa externa de mucina de al menos 20 μm de grosor que se depositará durante su paso por el oviducto (MURAKAMI y IMAI, 1996). El conejo presenta una placenta de tipo hemocorial según la clasificación de Grosser (*Figura 2*) de modo que existe una conexión directa entre el corión fetal y la sangre materna que permite el paso de inmunoglobulinas. El periodo de gestación del conejo es de en torno a 30 días, siendo de entre 30-32 días para las razas domésticas (HAMMOND, 1937; BREWER, 2006) y de 28-30 días para las razas silvestres (SOUTHERN, 1940; BREWER, 2006). Las crías nacen ciegas, puesto que no abrirán los ojos hasta el día 10, y sin ser capaces de sobrevivir por sí mismas presentando un peso aproximado de 65 g para la variedad *New Zealand White* (BREWER, 2006). Además, las hembras de conejo son capaces de ovular inmediatamente tras el post-parto y es común, especialmente para las razas silvestres, que mantengan simultáneamente un embarazo y la lactancia de la camada anterior, que se prolongará durante ocho semanas (BRAMBELL, 2009).

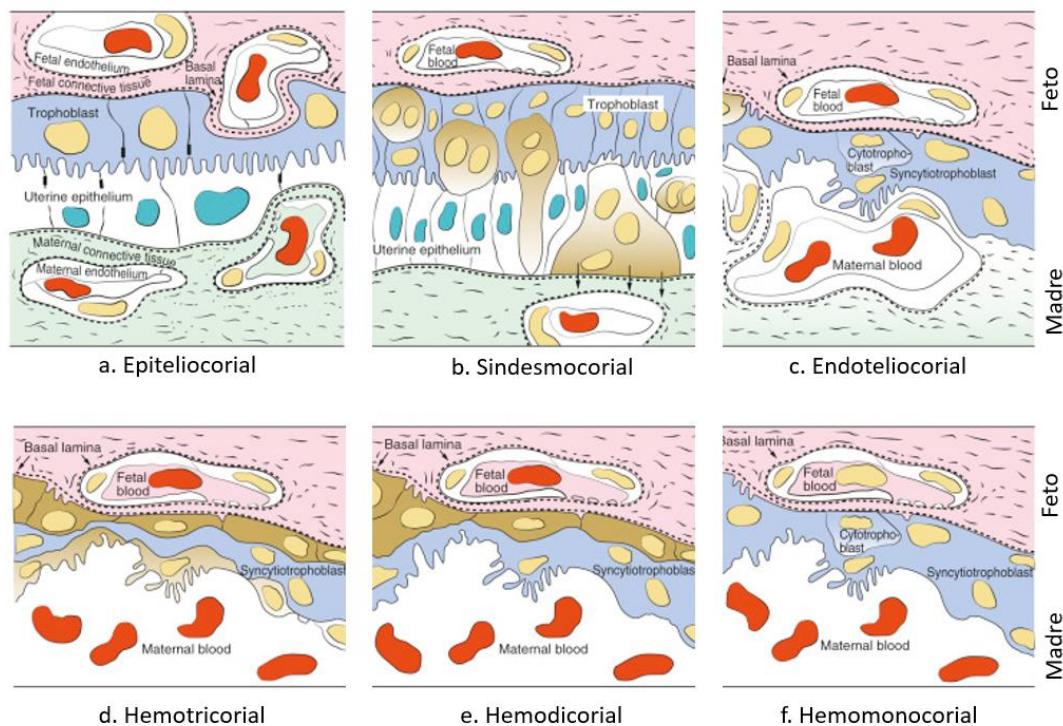


Figura 2: Clasificación de Grosser sobre el tipo placentario basada en la relación entre el corión y la pared uterina (Adaptado de TAVERNE, 2019).

1.4.2. Técnicas de manejo experimental del conejo

El conejo es un animal muy dócil y que no presenta un comportamiento agresivo. Estos animales son sensibles a diferentes infecciones como la sarna, por lo que los ejemplares recién adquiridos deben someterse a un período de cuarentena de al menos dos semanas (MAPARA *et al.*, 2012). Además, se estresan con facilidad, por lo que es importante reducir lo máximo posible el número de procedimientos a los que se le somete durante las investigaciones experimentales. Cuando sea preciso manipular al animal, este deberá sujetarse por el pescuezo empleando una mano mientras que la otra deberá situarse sosteniendo la parte posterior del animal desde abajo para evitar posibles daños en la columna (OXLEY *et al.*, 2016). Si no se maneja con precaución el conejo puede producir lesiones en forma de cortes y arañazos, especialmente en manos y antebrazos. Es importante tener en cuenta que los conejos adultos deben ser emplazados en jaulas individuales de suelo de rejilla y que estas deben estar suspendidas a una distancia igual o superior a 0.8 cm del suelo para que el excremento pueda ser recogido y evacuado por bandejas de recolección y de este modo no se acumule en la jaula (MAPARA *et al.*, 2012). Estas jaulas deberán estar contenidas en instalaciones que presenten una temperatura estable de entre 18-23°C, una humedad de entre 40-60% y una ventilación indirecta suficiente para reducir la contaminación olfativa pero que no induzca la formación de corrientes de aire que puedan enfermar a los animales (PUSCHEL *et al.*, 2010). Los conejos deben tener libre acceso a una fuente de agua, pero deberá racionarse su ingesta de alimentos puesto que aquellos ejemplares a los que se alimenta *ad libitum* acaban desarrollando obesidad.

2. OBJETIVOS

El uso de las técnicas de reproducción asistida está popularizándose a nivel global, de manera que, cada vez es mayor el número de personas que son concebidas mediante la utilización de alguna de estas técnicas. El primer paso para llevar a cabo estos tratamientos es la hiperestimulación ovárica, técnica que se aplica de manera rutinaria durante la realización de cualquier proceso de reproducción asistida. Es por ello que puede ser importante evaluar las modificaciones que pudiesen producir este tipo de tratamientos. En base a ello, los objetivos específicos de este trabajo son:

- ❖ Evaluar el efecto del tratamiento de hiperestimulación ovárica mediante la hormona recombinante corifolitropina alfa sobre la competencia espermática y la paternidad de la descendencia obtenida tras la inseminación artificial con una mezcla heterospermica.
- ❖ Evaluar el efecto que las modificaciones inducidas por los tratamientos de hiperestimulación ovárica mediante la hormona recombinante corifolitropina alfa producen sobre la calidad embrionaria mediante el estudio de la expresión génica de los genes de pluripotencia (OCT4, SOX2 y NANOG) en embriones preimplantacionales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Los animales empleados en este trabajo pertenecen a una línea sintética de la especie *Oryctolagus cuniculus* seleccionada por una combinación de tamaño de camada y ganancia media diaria durante el engorde desde 1980 (*Figura 3*). Todos los animales fueron proporcionados por las granjas del grupo de Mejora Genética Animal del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València.

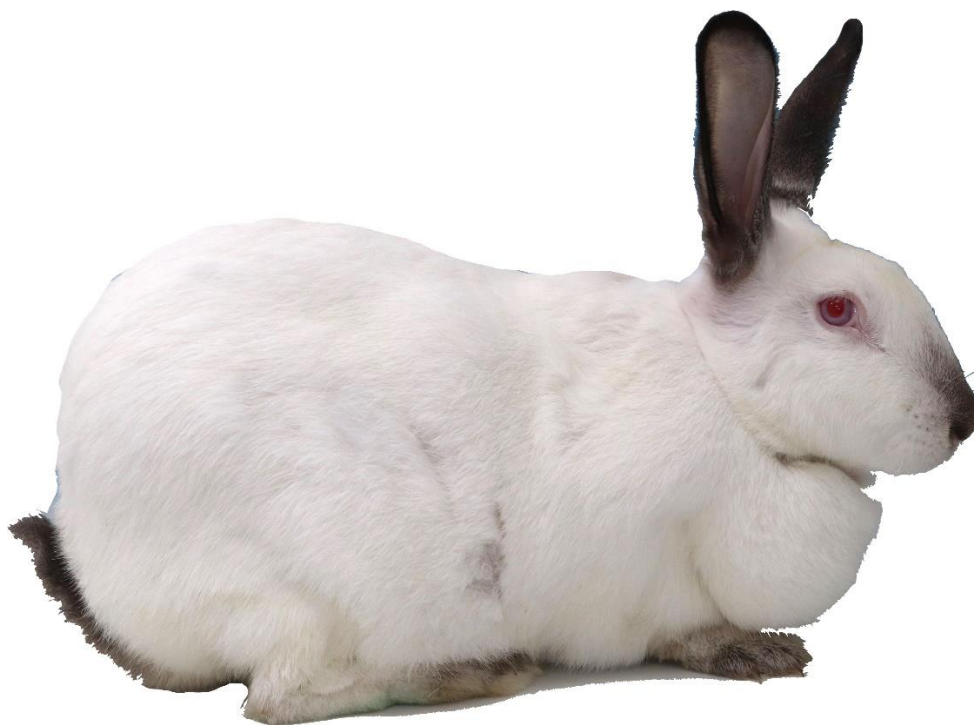


Figura 3: Imagen de un ejemplar de conejo perteneciente a una línea sintética seleccionada por una combinación de tamaño de camada y ganancia media diaria durante el engorde desde 1980.

Todas las hembras empleadas eran nulíparas que presentaban de 4 a 6 meses de edad. Los machos empleados procedían de la misma línea sintética y presentaban una edad similar.

Todos los animales se alojaron en jaulas individuales, bajo unas condiciones lumínicas controladas de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura media entre 17,5°C y 25,5°C. Los animales fueron alimentados con un pienso comercial, restringiendo la ingesta a un máximo de 135g diarios. El manejo animal se realizó de acuerdo con los procedimientos con número de registro 250V091, aprobados por la Generalitat Valenciana para la instalación cunícola número ES462500001091. Estos procedimientos también han sido revisados y aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (código 2018/VSC/PEA/0116), en conformidad con la Directiva 2010/63 de la normativa europea sobre experimentación con animales, y atendiendo a la legislación sobre experimentación animal del Real Decreto 53/2013 (BOE, 2013).

3.2. Obtención de ADN purificado

3.2.1. Extracción de sangre y obtención de ADN de los parentales

Para el desarrollo de este estudio se emplearon 14 hembras y 4 machos de los que se obtuvo una muestra de sangre para su extracción de ADN y de esta manera, realizar el análisis de la descendencia mediante microsatélites. Para ello, de cada ejemplar se extrajo sangre de la arteria central de la oreja mediante un catéter G22 (Intran Certo G22 0,9x25 mm, Iberomed, Pontevedra, España) en tubos con EDTA para evitar su coagulación (*Figura 4*). Se emplearon 0,5 ml de sangre total para realizar la extracción de ADN y su posterior purificación utilizando un kit comercial (*Molecular Biology EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit*, BioBasic, Markham, Canadá). Para ello, se siguió el protocolo recomendado por el fabricante salvo una ligera modificación al emplear 50 μ l de proteinasa K que se dejó actuar durante una incubación de 2 horas a 50°C. Una vez obtenido el ADN, su calidad se determinó mediante la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 260 nm empleando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C para su uso posterior.

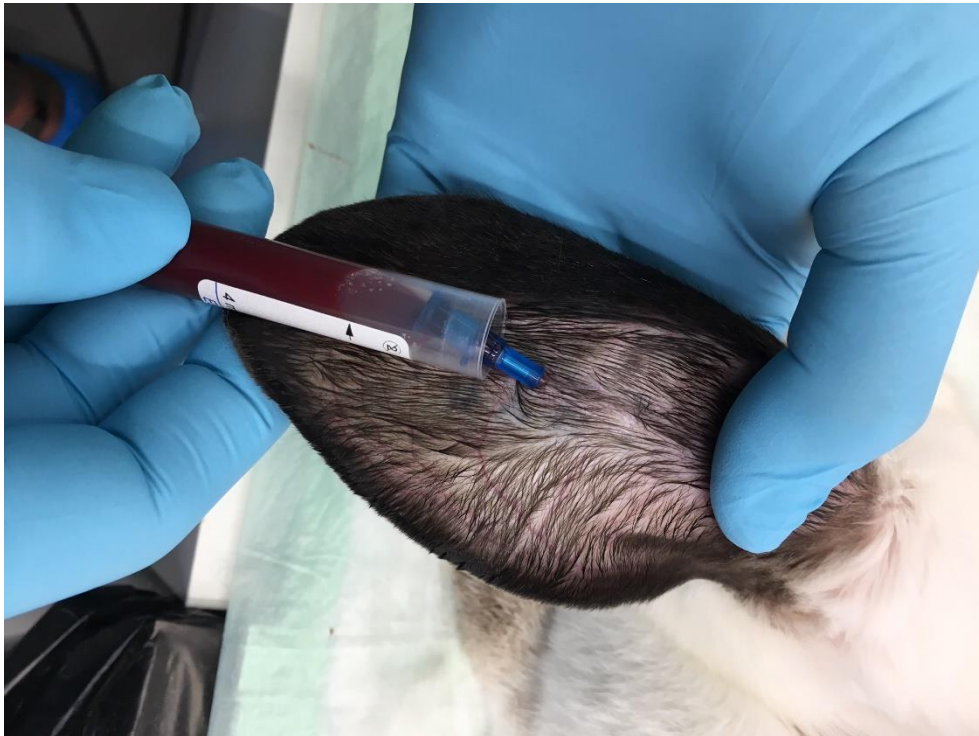


Figura 4: Imagen de la extracción de sangre de la arteria central de la oreja de un conejo.

3.2.2. Tratamiento de hiperestimulación ovárica

En este estudio se emplearon un total de 14 hembras que fueron divididas aleatoriamente en dos grupos:

-Grupo 1 (N=8): Hembras que no recibieron ningún tratamiento.

-Grupo 2 (N=6): Hembras hiperestimuladas

Hembras a las que se administró una única inyección subcutánea de 0,75 μ g/kg de peso de la hembra de una hormona corifolitropina alfa comercial (rFSH-CTP, Elonva® 150 μ g/mL, Merck Sharp & Dohme, Kenilworth, EEUU)

El grupo de las hembras sometidas a la hiperestimulación ovárica contenía un menor número de ejemplares pues se esperaba que cada una de estas hembras produjera un número de embriones superior a las producidas por las hembras del grupo control.

3.2.3. Realización de la inseminación heterospérmica

Tras 72 horas desde el tratamiento de hiperestimulación ovárica todas las hembras fueron inseminadas artificialmente. Para ello se extrajo un eyaculado de cada uno de los cuatro machos candidatos empleando de una vagina artificial, siguiendo el método descrito por VICENTE *et al.*, (2011). Posteriormente se obtuvo una alícuota de cada eyaculado para realizar un análisis de las características macroscópicas (color y volumen) y microscópicas (motilidad, concentración y morfoanomalías) siguiendo los criterios descritos por MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, (2010). Este análisis se realizó con el objetivo de determinar la calidad de los eyaculados y para ajustar la concentración de espermatozoides de cada uno de los machos a 4 millones (dosis total de 16 millones). Para llevar a cabo la valoración microscópica se obtuvo una muestra diluida (1:20) con una solución Tris-Cítrico-Glucosa determinando la motilidad, y otra muestra diluida (1:20) con una solución de glutaraldehído (0.25%) para las determinaciones de la concentración y morfoanomalías.

Motilidad

La motilidad se determinó mediante un sistema computarizado de análisis de la motilidad espermática (ISAS). Para ello se empleó una cámara Makler en un microscopio de contraste de fase negativo con una platina atemperada a 37°C. Los parámetros determinados fueron:

- Velocidad curvilínea (VCL) ($\mu\text{m/s}$): es la velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática. La distancia total que la cabeza del espermatozoide cubre en el período de observación. Es siempre el mayor de los tres parámetros de velocidad (VCL, VAP, VSL).
- Velocidad media (VAP) ($\mu\text{m/s}$): velocidad media del recorrido del espermatozoide. Es la distancia que el espermatozoide ha recorrido en su trayectoria durante el período de observación.
- Velocidad rectilínea (VSL) ($\mu\text{m/s}$): distancia en línea recta entre el primero y el último punto de la trayectoria recorrida. Da el espacio recorrido por el espermatozoide en el período de observación.
- Índice de rectitud (SRT) (%): estima la proximidad del recorrido seguido por los espermatozoides a una línea recta. Se calcula como el cociente entre la VSL y VAP, cuyo resultado se multiplica por 100. $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$.
- Índice de linealidad (LIN) (%): estima la proximidad de las trayectorias de los espermatozoides a una línea recta. Es el cociente entre VSL y VCL, cuyo resultado se multiplica por 100. $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$.
- Índice de oscilación (WOB) (%): estima la relación entre la trayectoria recorrida por el espermatozoide y la oscilación de la cabeza espermática. Se calcula como el cociente entre VAP y VCL, cuyo resultado se multiplica por 100. $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$.
- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH): es el desplazamiento medio realizado por la cabeza del espermatozoide en su recorrido curvilíneo de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
- Frecuencia de batido de la cabeza (BCF) (Hz): frecuencia con que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal media en función del tiempo.

Concentración espermática

La concentración espermática fue determinada mediante el empleo de una cámara cuenta glóbulos Thoma-Zeiss (Marienfeld, Alemania) (Figura 5).



Figura 5: Imagen de la cámara cuenta glóbulos Thoma-Zeiss empleada para determinar la concentración espermática.

Morfología espermática

La valoración morfológica se determinó a 400 aumentos mediante microscopía de contrastes de fases, evaluando el porcentaje de espermatozoides anormales (cabeza, pieza intermedia y cola) en cada una de las muestras.

Inseminación heterospérmica

Una vez se determinó que todos los machos presentaban características seminales idóneas para su uso en inseminación artificial (motilidad superior al 75% y menos del 25% de morfoanomalías) se prepararon dosis seminales ajustando la dosis a 16 millones de espermatozoides (4 millones/macho). La inseminación artificial se realizó vía vaginal mediante el uso de una cánula comercial. Tras depositar la dosis en el fondo de la vagina, las hembras fueron inducidas a ovular mediante una inyección intramuscular de 1 µg del análogo sintético de la GnRH, acetato de busrelina (Suprefact; Hoechst Marion Roussel, Höchst, Alemania).

3.2.4. Perfusión de los oviductos y recuperación de los blastocistos

Seis días después de la inseminación todas las hembras gestantes fueron eutanasiadas mediante la inyección de un tiobarbitúrico, obteniéndose el tracto reproductivo, que se trasladó al laboratorio, donde se procesaron a temperatura ambiente. Para ello se hizo una perfusión de oviducto y útero con 10 mL de tampón fosfato alcalino (DPBS, Dulbecco's phosphate buffer serum) suplementado con 0,2% (v/w) de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, St. Luis,, EEUU) 0,132 g/L de CaCl₂ y antibiótico (Penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaica 700.000 UI y sulfato de dihidrostreptomina 1250 mg/L, Penivet, Divasa Farmavic, Barcelona, España) para recuperar los embriones preimplantacionales (Figura 6).

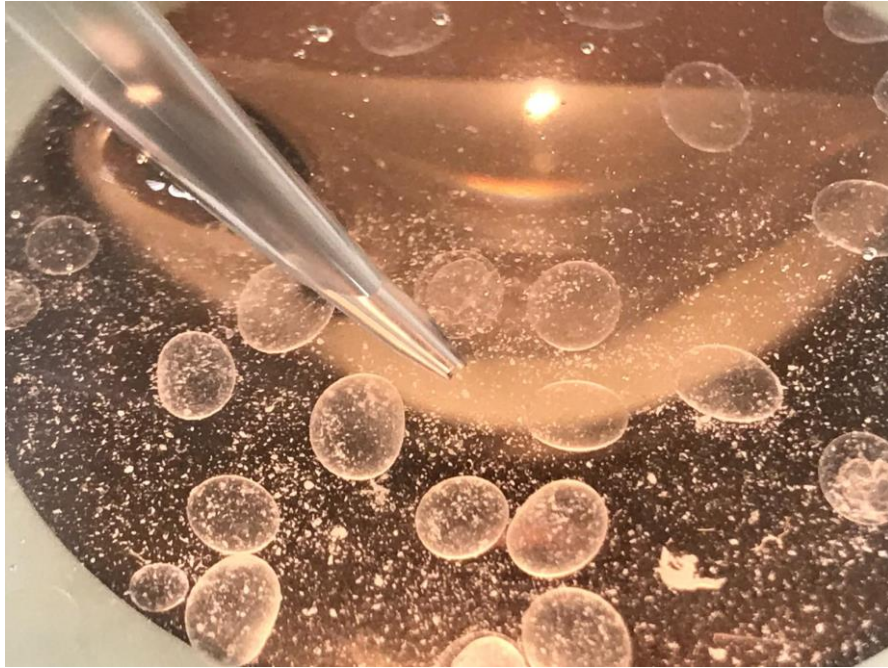


Figura 6: Imagen de los blastocistos recuperados a los seis días en el medio de perfusión.

Se determinó el número de embriones recuperados, calculando así la tasa de recuperación (TR). De cada una de las hembras se seleccionaron aleatoriamente hasta un máximo de 25 embriones, que fueron aislados individualmente y depositados en 10 μ l de tampón de lisis (100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM KCl, 0,02% gelatina, 0,45% Tween 20 y 60 μ g/mL tARN de levadura (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU) siguiendo el protocolo descrito por SAKURAI et al (2014). Posteriormente, se añadieron 400 μ l/mL de proteinasa K, incubando en un primer paso a 65°C durante 1 hora, seguido de otra etapa a 95°C durante 10 minutos. Además, se recuperaron los ovarios, sobre los que se realizó el recuento de cuerpos lúteos, obteniendo de este modo la tasa de ovulación (TO) (*Figura 7*).

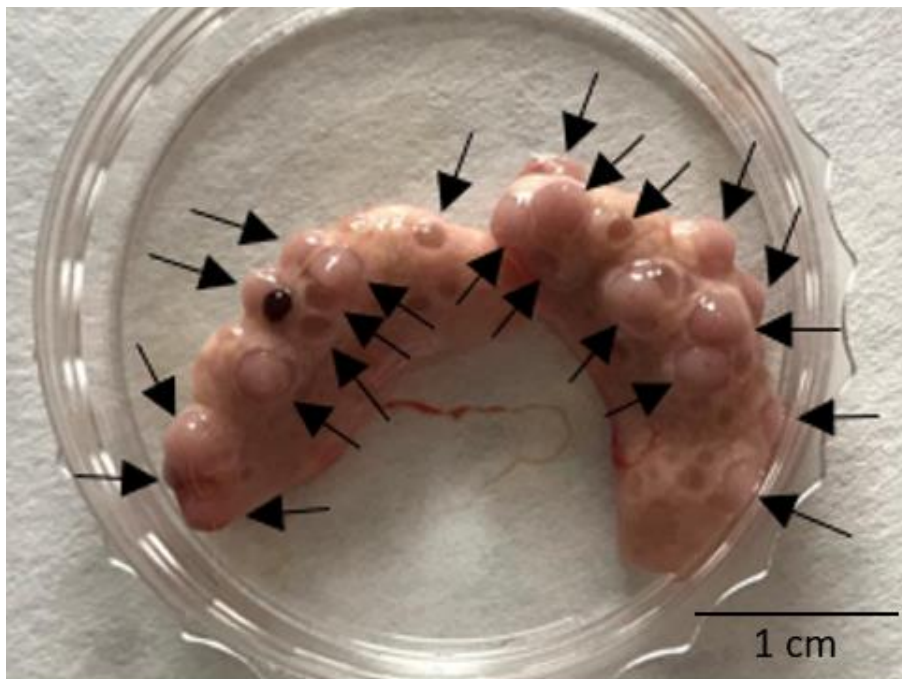


Figura 7: Imagen de los ovarios recuperados de una hembra superovulada sacrificada donde se aprecian los cuerpos lúteos (marcados con una flecha), cuyo número determinó la tasa de ovulación.

3.2.5. Purificación del ADN de la descendencia

La purificación de ADN de los blastocistos se realizó empleando el mismo kit y metodología descritos anteriormente. La calidad se determinó mediante la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 260 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU). El ADN fue entonces almacenado a -20°C para su uso posterior.

3.3. Análisis de los microsatélites

3.3.1. Amplificación del ADN (PCR) y secuenciación de los microsatélites

El ADN, tanto de los parentales como de la descendencia, fue sometido a una amplificación de las secuencias correspondientes a los microsatélites a estudiar mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un equipo GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster city, EEUU). Tanto la relación de los genes empleados como las secuencias de los cebadores utilizadas durante la amplificación se muestran en la tabla 1. Cada PCR se realizó con una concentración de 3 µL de ADN, previamente diluido a 1:30, una concentración variable de los cebadores directos y reversos y 5 µL de una solución *Taq* PCR Master Mix de la empresa Quiagen (Venlo, Holanda) en un volumen total de 10 µL.

Tabla 1: Características de los cebadores empleados en la PCR, secuencia del cebador y tamaño del fragmento amplificado.

Nombre	Secuencias de los cebadores	Tamaño	Accesión	Referencia
INRACCDD V0137	Fw: 5'TACATTGAAAGGAAGCGAAGG	239-247	AJ874477	GRIMAL et al 2012
	Rv: 5'ATGGACGACATTTGTCCCATA			
INRACCDD V0036	Fw: 5'CGCACAGACTCAACATCCAG	175-183	AJ874398	GRIMAL et al 2012
	Rv: 5'CCCTACAGGCAGAGGCTTAAT			
INRACCDD V0157	Fw: 5' AACACTTGCCCCTCTTTTCAT	118-124	AJ874497	GRIMAL et al 2012
	Rv: 5'CAGGTTGTGGGAGTTCTTGTC			
INRACCDD V0087	Fw: 5'GATCTGGGACTCCAGAGTGTC	190-214	AJ874430	GRIMAL et al 2012
	Rv: 5' GAACACCGGTCTGGATGG			
INRACCDD V0035	Fw: 5' AACCACCAGGGTCAGCTTC	170-194	AJ87397	GRIMAL et al 2012
	Rv: 5' AGAGTGAGCGAGCGAGAGAC			

Como se desprende de la tabla anterior, se emplearon unos cebadores diferentes para la amplificación de cada microsatélite participante en el estudio conforme a la bibliografía existente y descrita en la tabla 1. Además, como algunos de los cebadores utilizados requerían condiciones diferentes durante la amplificación, cada una de las muestras fue sometida a dos procesos de amplificación diferentes. Las condiciones empleadas para la amplificación de los microsatélites INRACCDDV0137 y INRACCDDV0036 se detallan en la tabla 2, mientras que aquellas utilizadas en la amplificación de los microsatélites INRACCDDV0157, INRACCDDV0087 y INRACCDDV0035 se detallan en la tabla 3.

Tabla 2: Programa de tiempos y temperaturas utilizadas en la PCR para los microsatélites INRACCDDV0137 y INRACCDDV0036.

Proceso	Número de ciclos	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
Activación de la ADN polimerasa	1	3	94
Denaturalización	50	0,5	95
Hibridación	50	1	60
Extensión	50	0,5	72
Elongación final	1	10	72

Tabla 3: Programa de tiempos y temperaturas utilizadas en la PCR para los microsatélites INRACCDDV0157, INRACCDDV0087 y INRACCDDV0035.

Proceso	Número de ciclos	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
Activación de la ADN polimerasa	1	3	94
Denaturalización	50	0,5	95
Hibridación	50	0,5	60
Extensión	50	0,5	72
Elongación final	1	10	72

Posteriormente, las muestras amplificadas fueron sometidas a un proceso de secuenciación de los microsatélites de interés en un secuenciador CEQ 8000 (Beckman Coulter, Brea, EEUU) mediante electroforesis capilar con marcaje de fluorescencia siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. (*Figura 8*)



Figura 8: Imagen del secuenciador CEQ 8000 (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) empleado durante la secuenciación de los microsátélites de interés.

3.3.2. Establecimiento de la paternidad de la descendencia

Una vez completada la secuenciación de los microsátélites presentes en el ADN de los parentales se realizó el análisis de fragmentos (patrón de picos) de cada una de las muestras (Figura 9), determinando el genotipo de cada uno de los animales adultos para dichos microsátélites. De este modo se pudo establecer los alelos presentes en la población del estudio para cada uno de los *loci* de interés.

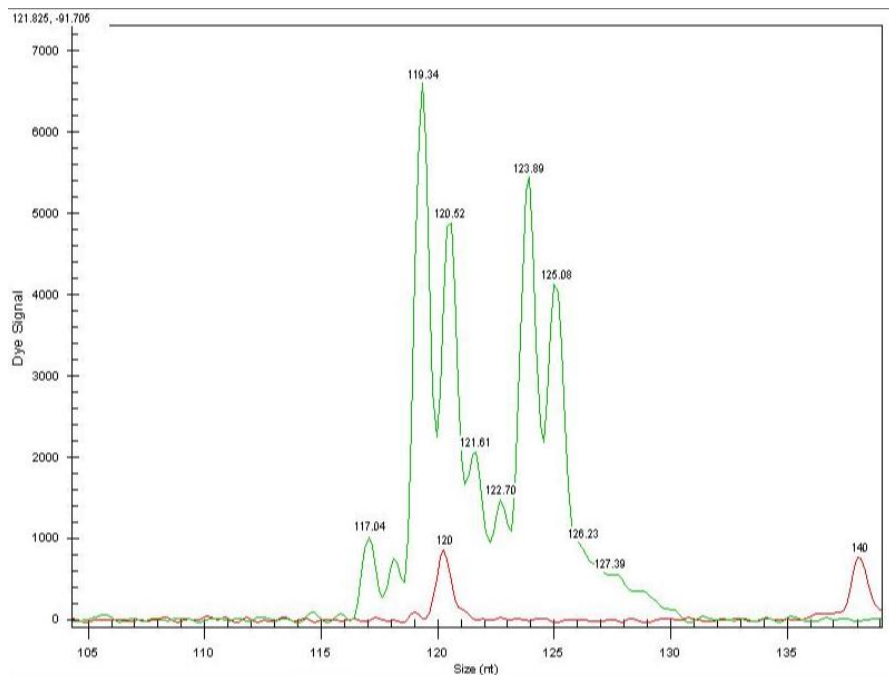


Figura 9: Ejemplo del patrón de picos observados tras hacer la secuenciación de microsátélites para el gen INRACCDDV0157 en una muestra de ADN de una hembra superovulada.

Una vez se hubo identificado el genotipo de los parentales para cada uno de los microsatélites se estudió el patrón de picos exhibido tras la secuenciación por el ADN aislado de la descendencia para cada uno de los *loci* de interés. Finalmente se elaboró un documento Excel (Microsoft, Redmond, USA) con los datos relativos al genotipo de los parentales y la descendencia para cada uno de los microsatélites y se llevó a cabo la determinación de la paternidad de cada una de los blastocitos obtenidos mediante el programa informático de asignación de paternidades CERVUS (Field Genetics, London, Reino Unido). (Figura 10)

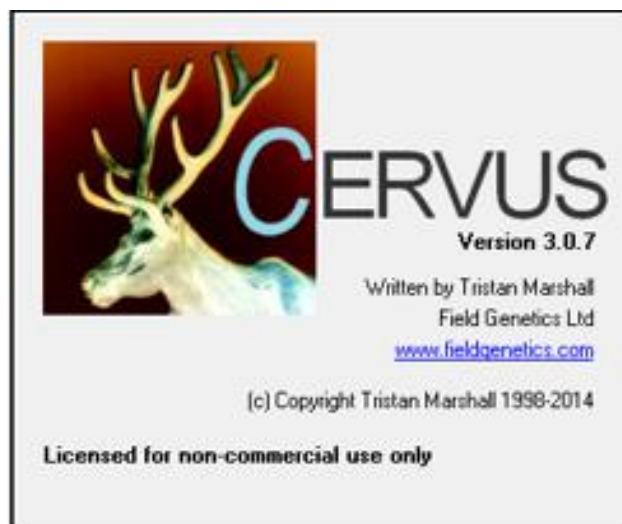


Figura 10: Imagen del programa informático CERVUS empleado para la asignación de paternidades

3.4. Evaluación de la expresión génica

Además, se analizaron los niveles de expresión de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* en una muestra de embriones de cada uno de los grupos experimentales. Estos genes fueron elegidos debido a que exhiben un papel fundamental en el mantenimiento de la pluripotencialidad en las células embrionarias (MEDVEDEV *et al.*, 2008; ZHANG y CUI, 2014) y el correcto desarrollo preimplantacional (NICHOLS *et al.*, 1998; AVILION, 2003; MITSUI *et al.*, 2003).

3.4.1. Extracción de ARN y retrotranscripción a ADN

La extracción de ARN se realizó a partir de grupos de 8-10 embriones en estadio de blastocisto. Se realizaron 2 réplicas biológicas para cada grupo experimental. El ARN total fue aislado utilizando un kit comercial (RNeasy® Plus Mini Kit, Quiagen, Venlo, Holanda) siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenó a -80°C para su uso posterior.

Posteriormente se realizó la purificación de las muestras mediante un tratamiento con enzimas ADNsas (Roche, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando la purificación de ARN hubo finalizado, se evaluó la calidad del ARN de las muestras mediante la absorbancia en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU). Tras esto se llevó a cabo la retrotranscripción utilizando un kit comercial (*qScript™ Synthesis Kit*, Quanta Biosciences, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para que todas las muestras de la PCR a tiempo real presentaran la misma concentración de ADN, y de este modo se pudieran comparar los resultados, se realizó una dilución de 500 ng de material genético de cada muestra y agua libre de DNAsas (Sigma-Aldrich, Steinheim Alemania) en un volumen final de 15 µL. Dichas diluciones fueron introducidas en un equipo 2070 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) en las condiciones descritas en la tabla 4. Finalmente, el cADN se almacenó a -20°C para su uso posterior.

Tabla 4: Programa de tiempos y temperaturas utilizadas para la preparación del cADN

Proceso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
Extensión de los cebadores	5	22
cADN síntesis	30	42
Finalización de la reacción	5	85

3.4.2. Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR)

Una vez se hubo realizado la extracción y purificación del ARN presente en las muestras, se realizó la cuantificación relativa de la expresión de los tres genes de interés mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) utilizando un termociclador modelo LightCycler® 96 System (Roche, Basilea, Suiza) y la enzima de detección SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, EEUU). La tabla 5 contiene una relación de los genes empleados, así como de las secuencias de los cebadores utilizadas durante la amplificación. Cada PCR se realizó por duplicado para cada muestra en placas de 96 pocillos empleando 3 µL de cADN, que se encontraba a una dilución previa de 1:20, 1 µL de cada uno de los cebadores necesarios diluidos a 5 µM y 5 µL de una solución SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) en un volumen final de 10 µL.

Tabla 5: Características de los cebadores empleados en la qPCR, secuencia del cebador y tamaño del fragmento amplificado

Nombre	Secuencias de los cebadores	Tamaño	Accesión	Referencia
OCT4	Fw: 5'CGAGTGAGAGGCAACTTGG	125	NM_001099957	MAMO et al 2008
	Rv: 5'CGGTTACAGAACCACACACG			
SOX2	Fw: 5'AGCATGATGCAGGAGCAG	270	NM_003106	WANG et al 2007
	Rv: 5' GGAGTGGGAGGAAGAGGT			
NANOG	Fw: 5' CCAGGTGCCTCTTACAGACA	104	ENSOCUT0000013777	VIUDES DE CASTRO <i>et al.</i> , 2015
	Rv: 5' TCACTACTCTGGGACTGGA			
H2AFZ	Fw: 5'AGAGCCGGCTGCAGTTCC	85	AF030235	MAMO et al 2008
	Rv: 5'CAGTCGCGCCACACGTCC			

Como puede apreciarse en la tabla anterior se utilizaron cebadores específicos para cada uno de los genes que participaron en el estudio, así como para el gen normalizador H2AFZ conforme a la bibliografía existente y descrita en la tabla 5. A continuación, se detallan las condiciones en las que se llevó a cabo la qPCR (Tabla 6)

Tabla 6: Programa de tiempos y temperaturas utilizadas en la qPCR.

Proceso	Número de ciclos	Tiempo (segundos)	Temperatura (°C)
Activación de la ADN polimerasa	1	600	95
Amplificación 1 ^{er} paso	40	1	95
Amplificación 2 ^o paso	40	30	60
Fusión	1	10	95
		60	65
		1	97
Enfriamiento	1	30	37

Posteriormente se realizó la normalización de los niveles de expresión de los genes de interés mediante la medición de los niveles de expresión del gen de referencia H2AFZ y de un calibrador obtenido a partir de una mezcla de cADN de todas las muestras para ajustar las posibles variaciones que se hubieran podido producir de ensayo a ensayo. Además, al finalizar la reacción se realizó una curva de disociación del producto amplificado para descartar la presencia de amplificaciones no específicas, contaminaciones o la formación de dímeros de cebador que hubieran podido producir errores en la medida de los niveles de expresión de los genes de interés.

A continuación, se llevó a cabo la cuantificación de los niveles relativos de expresión génica exhibidos por cada uno de los genes de interés en las diferentes condiciones objeto de estudio mediante la ecuación descrita por ROCHE APPLIED SCIENCE (2001) (Ecuación 1). Esta técnica permite calcular la magnitud de los cambios en los niveles de expresión de un gen mediante la comparación con un gen de referencia (PFAFFL, 2004).

$$\text{Ecuación 1: } \text{Ratio } N = E_{f_{\text{target}}}^{(Ct \text{ calibrador} - Ct \text{ muestra})} \cdot E_{f_{\text{Housekeeping}}}^{(Ct \text{ muestra} - Ct \text{ calibrador})}$$

3.5. Análisis estadístico

Los parámetros seminales (motilidad mediante programa ISAS y morfoanomalías) se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) empleando como factor fijo el macho (4 niveles) y como factor variable los parámetros seminales. El análisis del efecto del tratamiento de hiperestimulación ovárica sobre el patrón de paternidades se realizó mediante test *chi-cuadrado* con la corrección de Yate's. Por último, para el análisis del efecto del tratamiento de hiperestimulación ovárica sobre la tasa de ovulación, la tasa de recuperación de embriones, el peso total de los ovarios y los niveles de expresión de los genes SOX2, OCT4 y NANOG en la descendencia, se utilizó un ANOVA empleando como factor fijo el grupo experimental (2 niveles, hembra hiperestimulada o control). Se realizó además un test de normalidad sobre los datos de expresión génica de cada uno de los genes objeto de estudio (SOX2, OCT4 y NANOG) previo al análisis de la varianza.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software informático IBM SPSS STATISTICS (SPSS Inc, Chicago, EEUU) considerando como significativo un p-valor < 0,05.

3.6. Diseño experimental del TFG

La figura 11 muestra un esquema del diseño experimental de este trabajo que resume todo lo explicado anteriormente.

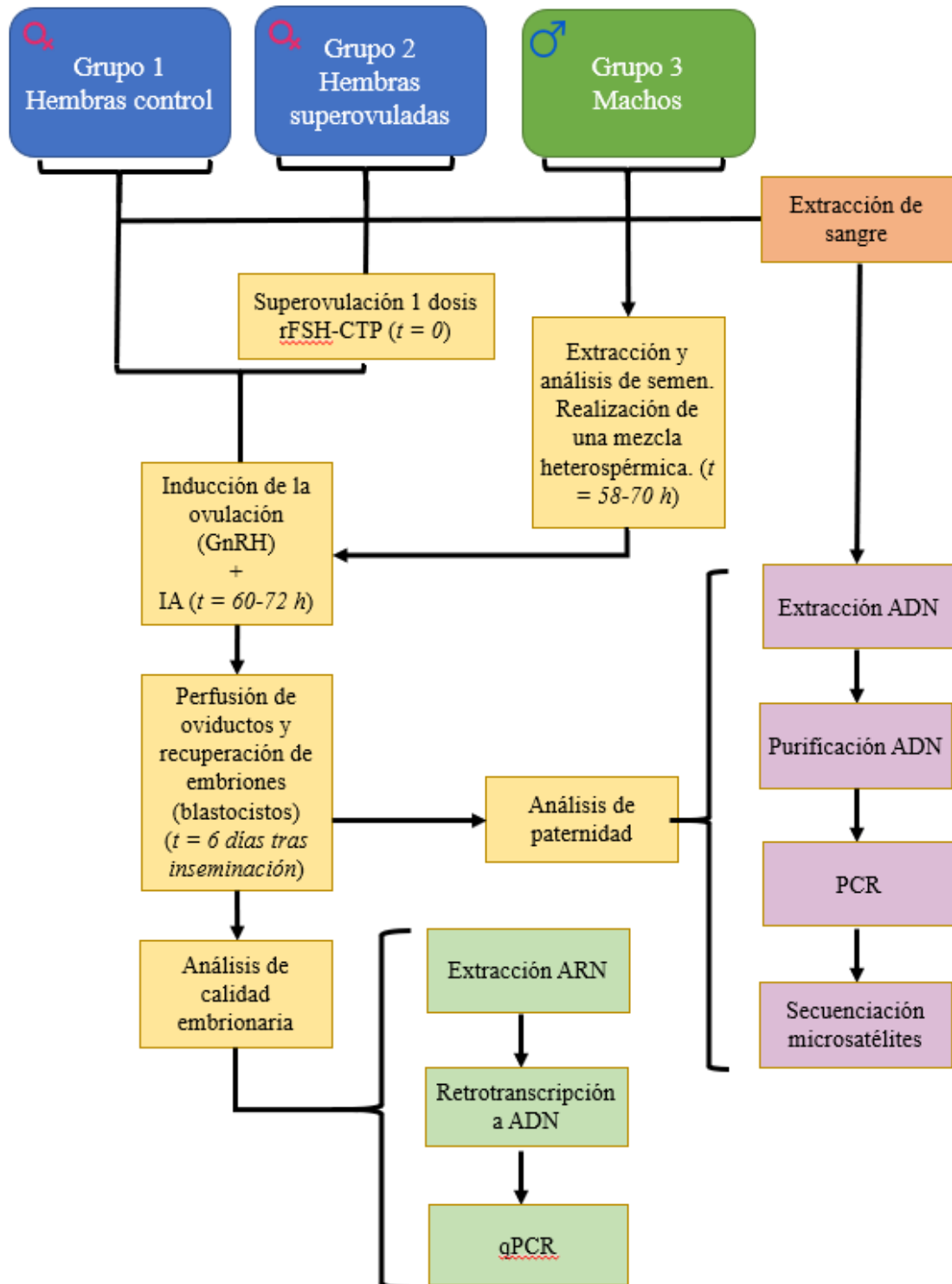


Figura 11: Diseño experimental del trabajo consistente en el estudio de los efectos que el tratamiento de hiperestimulación ovárica induce sobre la competencia espermática y la selección de la descendencia.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de los parámetros seminales de los diferentes eyaculados

En primer lugar, se evaluó la calidad de los eyaculados de los diferentes machos empleados en la mezcla heterospermica mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de los principales parámetros seminales (*Tabla 7*). Tal y como se puede observar, no existen diferencias significativas en los parámetros seminales entre los distintos machos (p -valor $> 0,05$).

Tabla 7: Análisis de los principales parámetros seminales para cada uno de los machos y su significación.

Parámetros	Machos				p-valor
	A	B	C	D	
Motilidad (%)	88,8 ± 3,74	81,9 ± 3,74	91,3 ± 3,74	87,2 ± 3,74	0,398
Morfoanomalías (%)	10,2 ± 3,53	12,5 ± 3,53	11,4 ± 3,53	9,9 ± 4,11	0,947
VCL (µm/s)	82,4 ± 6,66	87,7 ± 6,66	97,6 ± 6,66	99,1 ± 6,66	0,301
VSL (µm/s)	51,5 ± 5,10	41,8 ± 5,10	42,9 ± 5,10	41,7 ± 5,10	0,505
VAP (µm/s)	57,1 ± 4,63	59,2 ± 4,63	65,0 ± 4,63	64,7 ± 4,63	0,558
LIN (%)	50,8 ± 6,18	48,4 ± 6,18	44,5 ± 6,18	42,4 ± 6,18	0,773
SRT (%)	72,3 ± 4,41	70,4 ± 4,41	66,2 ± 4,41	64,8 ± 4,41	0,618
WOB (%)	69,5 ± 4,82	68,1 ± 4,82	66,9 ± 4,82	65,4 ± 4,82	0,938
ALH (µm)	2,7 ± 0,29	3,1 ± 0,29	3,2 ± 0,29	3,0 ± 0,29	0,712
BCF (Hz)	8,7 ± 0,46	8,7 ± 0,46	9,1 ± 0,46	8,1 ± 0,46	0,520

4.2. Estudio de la respuesta al tratamiento de hiperestimulación ovárica

Con el objetivo de analizar la respuesta de los diferentes sujetos del estudio al tratamiento de hiperestimulación ovárica y estudiar las diferencias que este tratamiento induce en comparación con los ciclos de ovulación naturales, se determinó la tasa de ovulación y la tasa de recuperación de embriones preimplantacionales. El tratamiento de hiperestimulación ovárica incrementa significativamente tanto la tasa de ovulación como el número de embriones recuperados (*Figura 12* y *Figura 13*).

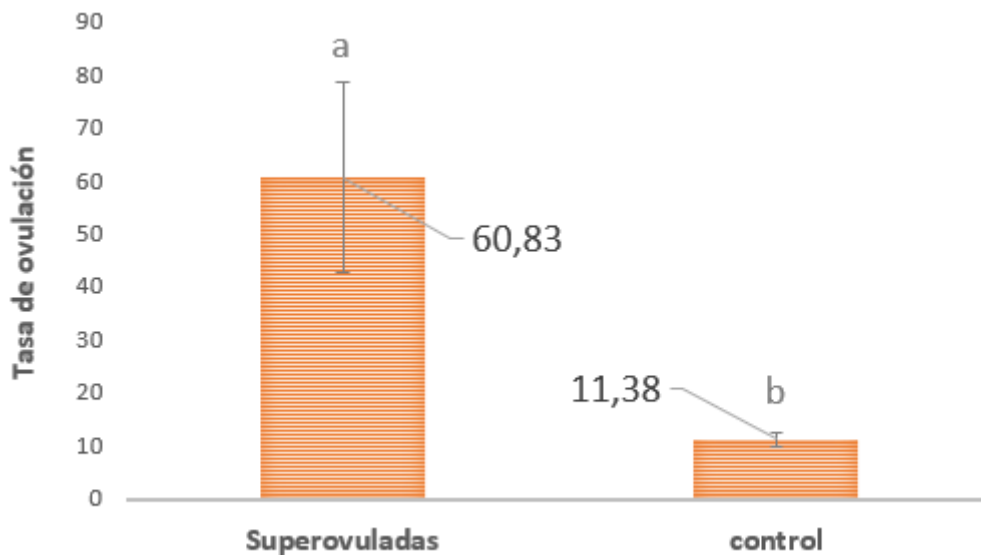


Figura 12: Tasa de ovulación exhibida por las hembras superovuladas vs las hembras control. Columnas con diferente letra representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

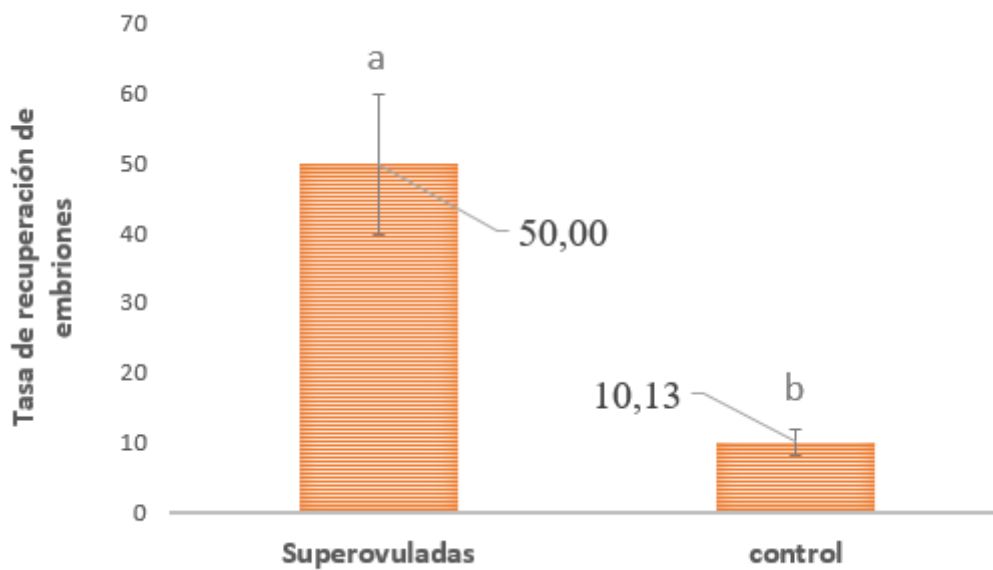


Figura 13: Tasa de recuperación de embriones de seis días exhibida por las hembras superovuladas vs las hembras control. Columnas con diferente letra representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Además, con el objetivo de estudiar el efecto y las posibles modificaciones que los tratamientos de hiperestimulación ovárica pueden producir sobre el ovario de las pacientes tras la recuperación de los embriones, se analizó el peso total de los ovarios recuperados de las hembras de ambos grupos experimentales (*Figura 14*).

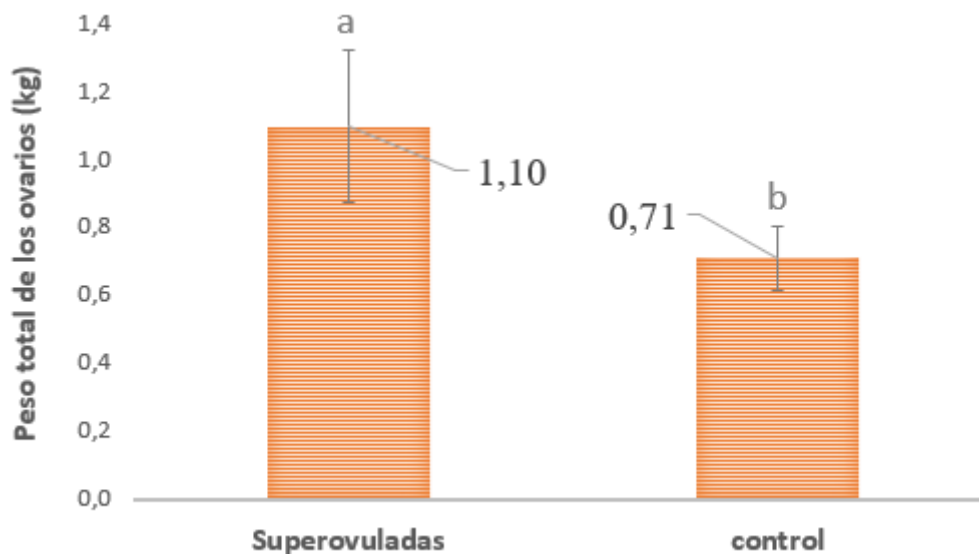


Figura 14: Peso total de los ovarios recuperados de las hembras superovuladas vs las hembras control. Columnas con diferente letra representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Como puede apreciarse en la figura anterior, también se observaron diferencias significativas en el peso total de los ovarios recuperados a partir de las hembras de cada uno de los grupos del estudio. Con el objetivo de descartar que las modificaciones en el peso de los ovarios recuperados observadas tras el tratamiento de hiperestimulación ovárica estuvieran influenciadas porque las hembras que componían cada uno de los grupos de estudio exhibiesen pesos corporales diferentes, se analizó también el peso total de las hembras de cada grupo el día del sacrificio (Figura 15).

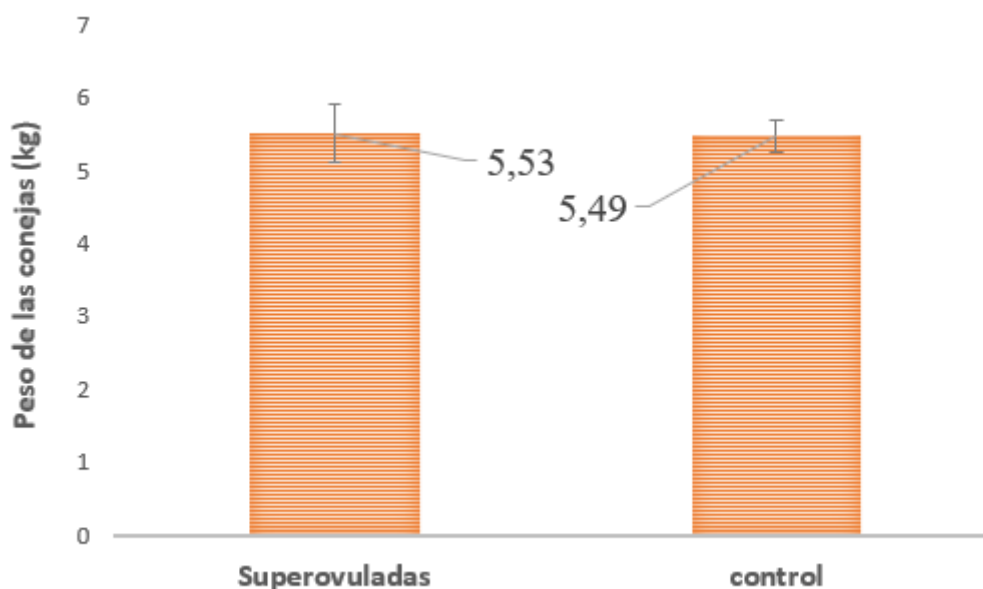


Figura 15: Peso total de las hembras superovuladas vs las hembras control el día del sacrificio. Columnas con diferente letra representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En este caso y como puede apreciarse en la figura previa, no se observaron diferencias significativas en el peso total de las conejas en función del grupo de estudio al que pertenecieran. ($p>0,05$) Esta observación nos permite asumir que las modificaciones en el peso total de los ovarios recuperados de las hembras de los diferentes grupos de estudio fueron ocasionadas por el tratamiento de hiperestimulación ovárica.

Los resultados obtenidos tras el estudio de la respuesta de las diferentes al tratamiento de hiperestimulación ovárica muestran que dicho tratamiento produce en las pacientes un incremento en la tasa de ovulación, la tasa de recuperación de embriones y la masa ovárica.

4.3. Estudio del efecto del tratamiento sobre la competencia espermática

A partir de todos los datos obtenidos tras la secuenciación de los microsatélites de interés de las muestras paternas se construyó una tabla estableciendo el genotipo tanto de los posibles padres como de las madres empleadas en el estudio (*Tabla 8*). Una vez se hubo identificado el genotipo de los parentales para cada uno de los microsatélites, se observó que a pesar de que todos los *locis* utilizados presentaban variabilidad en la población estudiada, el microsatélite INRACDDV0137 no mostraba variabilidad en la población de machos inseminadores, por lo que su estudio fue descartado en la descendencia ya que no ofrecía ninguna información sobre la posible paternidad de la misma.

Machos

Conejo	INRACDDV0036 (175-183)		INRACDDV0137 (239-247)		INRACDDV0157 (118-124)		INRACDDV0087 (190-214)		INRACDDV0035 (170-194)	
A	183	183	240	246	121	121	196	206	170	194
B	176	181	240	246	119	119	205	205	170	190
C	176	181	240	246	119	121	196	196	190	190
D	181	181	240	246	119	123	205	205	170	194
Alelos en la población:	176, 181, 183		240, 246, 249		119, 121, 123		196, 200, 205		170,190,194	

HEMBRAS

Coneja	INRACDDV0036 (175-183)		INRACDDV0137 (239-247)		INRACDDV0157 (118-124)		INRACDDV0087 (190-214)		INRACDDV0035 (170-194)	
1 Superovulada	181	181	240	240	119	119	189	196	190	190
2 Superovulada	181	183	240	249	119	123	205	205	190	190
3 Superovulada	181	181	240	246	119	121	200	205	170	194
4 Superovulada	181	183	240	240	119	119	196	205	-	-
5 Superovulada	176	181	240	240	119	123	205	205	-	-
6 Superovulada	181	183	246	246	119	119	196	205	-	-
7 Control	181	181	240	240	123	123	205	205	-	-
8 Control	181	183	240	240	123	123	196	205	-	-
9 Control	183	183	246	246	119	119	196	205	195	195
10 Control	176	183	246	246	119	119	196	196	170	190
11 Control	181	183	240	240	119	121	196	205	-	-
12 Control	181	183	240	240	119	121	196	205	190	190
13 Control	181	181	240	240	121	123	200	205	-	-
14 Control	181	181	240	246	119	119	196	205	-	-
Alelos en la población:	176, 181, 183		240, 246, 249		119, 121, 123		196, 200, 205		170,190,194	

Tabla 8: Genotipo de los machos cuyo semen se utilizó en la mezcla heterospermica (parte superior) y de las hembras participantes en el estudio (parte inferior) para los microsatélites de interés.

Una vez se obtuvo la información genética de los padres y madres participantes en el estudio y se establecieron los alelos presentes en la población para los microsatélites de interés, se realizó la secuenciación de la descendencia obtenida tanto del grupo de hembras control como de aquellas sometidas a un tratamiento de hiperestimulación ovárica para dichos microsatélites y se procedió a efectuar la asignación de paternidad de cada una de las crías obtenidas.

A partir de las crías cuya paternidad se estableció sin posibilidad de dudas y con el objetivo de estudiar la posibilidad de que el tratamiento de hiperestimulación ovárica produjese modificaciones en los procesos de selección espermática, se realizó una comparación del patrón de paternidades observado tras realizar dicho tratamiento respecto de aquel observado tras un ciclo de ovulación natural (*Figura 16*).

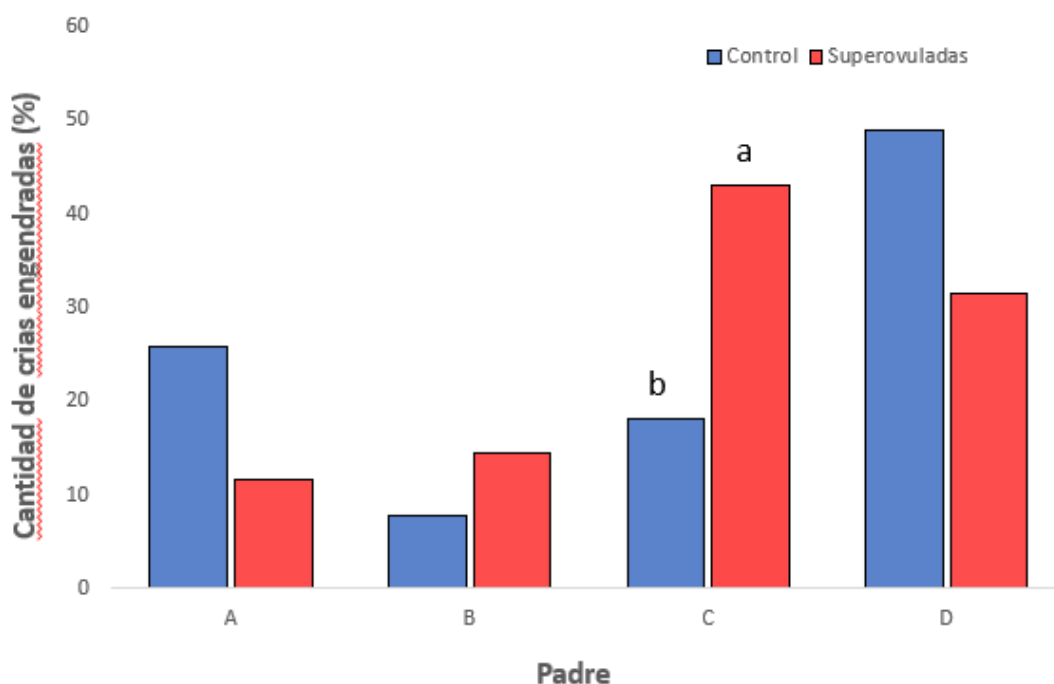


Figura 16: Comparación del número de crías engendrado por cada uno de los cuatro posibles padres tras un tratamiento de hiperestimulación ovárica y tras un ciclo de ovulación natural. Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para cada macho.

El análisis chi-cuadrado de toda la descendencia mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el patrón de paternidades observado tras la aplicación del tratamiento de hiperestimulación. Así, al analizar los resultados de cada macho por separado, es posible observar cómo el macho C ve aumentada su descendencia respecto a la obtenida en condiciones naturales, pasando del 19,9% de las crías en condiciones naturales al 42,9% tras la hiperestimulación. También se observa, aunque es este caso no es estadísticamente significativo, una reducción en el porcentaje de crías que engendradas por los machos A y D si se realiza previamente un tratamiento de hiperestimulación ovárica al pasar de engendrar el 25,6% de las crías en condiciones naturales al 11,4% tras él tratamiento y del 48,7% al 31,4% respectivamente. En cambio, el porcentaje de descendientes del macho B no se ve alterado.

4.4. Estudio del efecto del tratamiento sobre la expresión génica embrionaria

Con el objetivo de profundizar en como el tratamiento de hiperestimulación ovárica modifica la descendencia, se analizó la expresión de tres genes (SOX2, OCT4 y NANOG) (Figura 17). Se eligieron estos genes puesto que su expresión está relacionada con el mantenimiento de la pluripotencialidad en el desarrollo embrionario temprano y, por tanto, cualquier variación en los niveles de expresión de estos genes podría estar relacionado con alteraciones en el estado de desarrollo de los embriones.

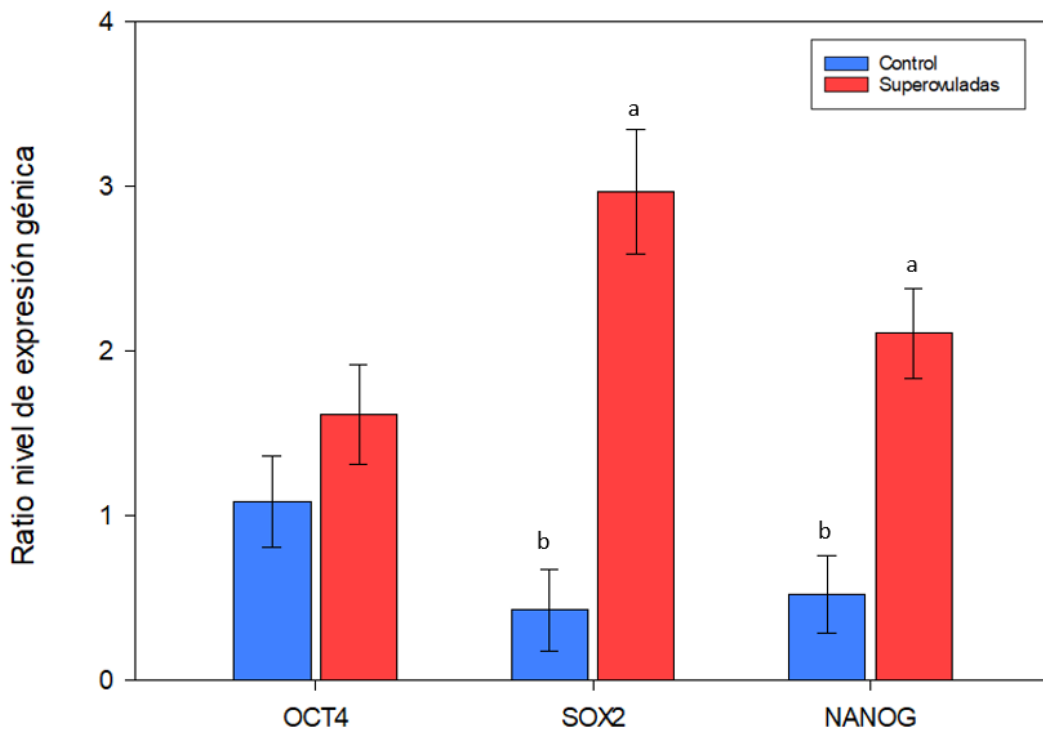


Figura 17: Comparación del nivel de expresión génica de los genes OCT4, SOX2 y NANOG en embriones engendrados tras un ciclo de ovulación natural respecto de aquellos engendrados tras un tratamiento de hiperestimulación ovárica. Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para cada uno de los genes.

Tras el estudio de los niveles de expresión génica exhibidos por los embriones, se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los genes SOX2 y NANOG entre embriones engendrados tras un ciclo de ovulación natural y tras un tratamiento de hiperestimulación ovárica, siendo la expresión de ambos genes superior en los embriones producidos tras el tratamiento de superovulación. También se observó que los niveles de expresión del gen OCT4 eran superiores en los embriones producidos tras el tratamiento de hiperestimulación ovárica, pero en este caso la diferencia no era estadísticamente significativa entre los embriones de cada grupo y por tanto se constató que la expresión de este gen no se ve afectada por la realización del tratamiento de hiperestimulación ovárica.

5. DISCUSIÓN

El tratamiento de hiperestimulación ovárica o superovulación, es una técnica que se emplea rutinariamente en todos los procedimientos de reproducción asistida debido a que permite la obtención de un mayor número de ovocitos por hembra, y con ello, la producción de más embriones, reduciendo el número de pacientes y/o tratamientos a realizar (CORTELL *et al.*, 2010; GAD *et al.*, 2011; ORTEGA *et al.*, 2018). Desde 1978, año en el que nació el primer bebé humano concebido mediante un tratamiento de reproducción asistida (TRA) se estima que han sido concebidos alrededor de 5 millones de niños en todo el mundo utilizando estas técnicas (ADAMSON *et al.*, 2013). Es más, se prevé que para el año 2100 habrán nacido entre 157 y 354 millones de personas mediante este tipo de técnicas (FADDY *et al.*, 2018). Por ello y debido al enorme impacto sobre la salud pública que pueden tener estos tratamientos en el futuro próximo, es imprescindible optimizar y analizar los riesgos de estas técnicas hasta asegurar su completa inocuidad y seguridad (ORTEGA *et al.*, 2018). Por tanto, es necesario conocer y comprender las modificaciones que inducen este tipo de tratamientos en los mecanismos moleculares que regulan la fecundación y el desarrollo embrionario en condiciones naturales (GAD *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio, basados en la realización de un tratamiento de hiperestimulación ovárica mediante una única inyección de FSH recombinante unida a una hormona corifolitropina alfa de liberación prolongada (rFSH-CTP), se muestran efectivos para el incremento de óvulos y embriones producidos (POLLARD *et al.*, 2007; CORTELL *et al.*, 2010; GAD *et al.*, 2011). Así, este tratamiento permite reducir el número de inyecciones necesarias para producir la estimulación ovárica y, por tanto, limitar el estrés al que se ven sometidos los animales (VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2017; 2019; VICENTE *et al.*, 2018), aunque se ha demostrado que produce una reducción de la viabilidad *in vivo* de los embriones si no se suplementa con LH (VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2017) o hCG (VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2019). En este estudio se ha observado un incremento significativo en la masa total de los ovarios tras la realización del tratamiento de hiperestimulación ovárica. Además, se ha descartado que dicho incremento en la masa ovárica estuviera ocasionado por un patrón asimétrico en el tamaño medio de los animales pertenecientes a cada grupo de estudio. Por tanto, el incremento de la masa ovárica observado puede ser explicado por el aumento en el crecimiento de los folículos y la producción de ovocitos maduros ocasionada por los tratamientos de este tipo (POLLARD *et al.*, 2007; CORTELL *et al.*, 2010; GAD *et al.*, 2011). En este sentido, los resultados de este estudio muestran un incremento notable en la respuesta ovárica de las hembras de conejo tras la aplicación del tratamiento de hiperestimulación ovárica. En concreto, se ha observado que la tasa de ovulación y la de recuperación de embriones preimplantacionales se ha quintuplicado. Estos resultados son similares a los descritos en otros estudios que emplean el modelo conejo (KAUFFMAN *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 1999; VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2009; 2017). Es posible, sin embargo, que el tratamiento de hiperestimulación ovárica produzca modificaciones en la calidad de los ovocitos liberados, que si bien no son suficientes para impedir su fecundación o el desarrollo hasta el estadio de blastocisto si alteren los patrones de expresión génica y el nivel de actividad metabólica que acaben conduciendo a la pérdida de viabilidad embrionaria posterior (PARVEX 1982; ERTZEID y STORENG 1992; GAD *et al.*, 2011; VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2017; 2019). En este estudio se ha observado que los patrones de expresión de los genes SOX2 y NANOG en embriones de seis días de conejo se veían significativamente alterados por el tratamiento de hiperestimulación ovárica en comparación con embriones de la misma edad producidos tras una ovulación natural. Estos genes exhiben un papel fundamental en el mantenimiento de la pluripotencialidad en las células embrionarias (MEDVEDEV *et al.*, 2008; ZHANG & CUI, 2014) y el correcto desarrollo preimplantacional (AVILION, 2003; MITSUI *et al.*, 2003). De modo que la sobreexpresión de estos genes, observada en los embriones tras un tratamiento de hiperestimulación ovárica en comparación con los embriones engendrados de forma natural, parece indicar que las células de

estos últimos se encuentran en un estadio más diferenciado (VAN DER AUWERA, 2001), de manera que los tratamientos de hiperestimulación ovárica inducen un retraso en el desarrollo embrionario preimplantacional *in vivo*. Además, el incremento en la expresión de SOX2 y NANOG en los embriones tras el tratamiento de hiperestimulación ovárica puede relacionarse con un aumento en la actividad metabólica de los mismos (GAD *et al.*, 2011) que, siguiendo la hipótesis del embrión tranquilo propuesta por LEESE, (2002), se correspondería con embriones que presenten una viabilidad reducida respecto de aquellos producidos en condiciones naturales (PARVEX, 1982; ERTZEID y STORENG, 1992; GAD *et al.*, 2011; VIUDES DE CASTRO *et al.*, 2017; 2019).

Además, se ha observado que, en todas las condiciones del estudio (tanto en el grupo de hembras que habían sido sometidas al tratamiento de hiperestimulación ovárica como en el grupo que siguió una ovulación natural), se produjeron diferencias en la proporción de descendencia engendrada por cada macho a pesar de que todos ellos presentaban parámetros seminales similares, de acuerdo con la bibliografía existente (BEATTY, 1960; DZIUK, 1996; VICENTE *et al.*, 2004). Estas diferencias en la proporción de la descendencia obtenida a pesar de la similitud en las características seminales podrían indicar que en el tracto reproductivo de la hembra se produce una selección no aleatoria del espermatozoide que realiza la fecundación (HOLT y FAZELI, 2015; GARCIA-VAZQUEZ *et al.*, 2016), por lo que se establecen patrones de dominancia entre diferentes eyaculados en función de la capacidad que muestran sus espermatozoides para ser seleccionados (DZIUK, 1996; VICENTE *et al.*, 2004). Esta capacidad puede ser dependiente de la rapidez relativa que presente cada eyaculado para recorrer el tracto reproductivo de la hembra (ROBL and DZIUK, 1988), de la supervivencia y preservación que exhiban los espermatozoides en el interior del medio uterino-oviductal de cada hembra (VICENTE *et al.*, 2004), de la interacción directa con las células epiteliales de la unión útero-tubárica (PACEY *et al.*, 1995; NAKASHINI *et al.*, 2004; OKABE, 2015) o de cualquier combinación de los factores anteriores. Ahora bien, una vez se ha comprobado que existe una selección específica del espermatozoide que va a realizar la fecundación por parte del tracto reproductivo de la hembra, cabe preguntarse si los tratamientos de hiperestimulación ovárica inducen cambios en los mecanismos moleculares que regulan dicha selección. En este sentido, varios estudios han demostrado que los tratamientos de hiperestimulación inducen alteraciones en el transporte y la selección de los espermatozoides (HUNTER *et al.*, 1999; GREVE y CALLESEN 2001; MADDISON *et al.*, 2017), el patrón de expresión de proteínas (BOOMSMA *et al.*, 2009; 2010; MADDISON *et al.*, 2017) y los niveles de glicosilación proteica (PEREZ-RUIZ *et al.*, 2018). A su vez, los resultados de este estudio muestran diferencias significativas en los patrones de paternidad obtenidos tras inseminar hembras sometidas a un tratamiento de hiperestimulación ovárica y hembras que siguieron ciclos de ovulación naturales. Esto es debido a que no todos los eyaculados reaccionan de la misma manera a las modificaciones producidas por el tratamiento de hiperestimulación ovárica. Así, se ha observado que algunos machos presentan una mayor capacidad fecundante bajo un ambiente uterino de hembras hiperestimuladas, mientras que otros machos ven reducida su capacidad fecundante bajo estas condiciones. Por ello, nuestros resultados parecen indicar que las modificaciones en el ambiente uterino-oviductal ocasionadas por los tratamientos de hiperestimulación ovárica (GREVE y CALLESEN 2001; GAD *et al.*, 2011) afectan de manera diferencial a los espermatozoides en función del macho, provocando de esta manera modificaciones en los mecanismos de selección de espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra (HUNTER *et al.*, 1999; GREVE y CALLESEN 2001; MADDISON *et al.*, 2017) y por tanto induciendo la formación de una descendencia diferente a aquella que se habría producido en condiciones naturales.

6. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que:

- ❖ El tratamiento de hiperestimulación ovárica con la hormona recombinante corifolitropina alfa estimula la respuesta ovárica de la hembra produciendo un incremento en la masa ovárica, la tasa de ovulación y la tasa de recuperación en embriones de seis días. Sin embargo, este tipo de tratamientos parece afectar a la calidad de los embriones producidos ya que estos exhiben un patrón diferencial de expresión de mRNA de los genes (SOX2 y NANOG).
- ❖ Los tratamientos de hiperestimulación ovárica con la hormona recombinante corifolitropina alfa afectan a la competencia espermática y alteran la paternidad de la descendencia obtenida tras la inseminación artificial con una mezcla heterospérmica.

7. REFERENCIAS

- ADAMS, C.E. (1965). The influence of maternal environment on *Preimplantation stages of pregnancy in the rabbit*. Editorial CIBA Foundation Symposium. Basel, 345-377
- ADAMS, C.E. (1970). The development of rabbit eggs after culture in vitro for 1-4 days. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 23: 21-34.
- ADAMSON, G.D., TABANGIN, M., MACALUSO, M. and MOUZON, J. (2013). The number of babies born globally after treatment with the assisted reproductive techniques (ART). *Fertility and Sterility*, 100: 42.
- AVILION, A.A. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development*, 17: 126-140.
- BEATTY, R.A. (1960). Fertility of mixed semen from different rabbits. *Reproduction*, 1: 52-60.
- BEATTY, R.A., BENNET, G.H., HALL, J.G., HANCOCK J.L., and STEWART, D.L. (1969). An experiment with heterospermic insemination in cattle. *Journal of Reproductive fertility*, 19: 491-502.
- BECKERS, J.F. (1987). Isolation and use of porcine FSH to improve the quality of superovulation in cattle. *Theriogenology*, 27: 213.
- BEHRINGER, R., GERTSENSTEIN, M., NAGGY, K.V. and NAGGY, A. (2018). Administration of gonadotropins for superovulation in mice. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018.
- BELLAMY, L. and POMIANTOWSKY, A. (2011). Why promiscuity pays. *Nature*, 479: 184-186.
- BERGER, T. and DALLY, M. (2001). Do sire-dam interactions contribute significantly to fertility comparisons in heterospermic insemination trials. *Theriogenology*, 56: 535-543.
- BOLET, G., BRUN, J.M., MONNEROT, M, ABENI, F., ARNAL C., and ARNOLD J. (2000). Evaluation and conservation of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) genetic resources. First results and inferences, en: *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress*, vol. A, Valencia: 281-315.
- BOOMSMA, C.M., KAVELAARS, A., EIJKEMANS, M.J., AMAROUCHI, K., TEKLENBURG, G., GUTKNECHT, D., FAUSER, B.J., HEIJNEN, C.J. and MACKLON, N.S. (2009). Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. *Reproductive Biomedicine*, 18: 85-94.
- BOOMSMA, C.M., KAVELAARS, A., EIJKEMANS, M.J., FAUSER, B.C., HEIJNEN, C.J. and MACKLON, N.S. (2010). Ovarian stimulation for in vitro fertilization alters the intrauterine cytokine, chemokine and growth factor milieu encountered by the embryo. *Fertility and Sterility*, 94: 1764-1768.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M. and DAVIS, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- BRAMBELL, F.W.R. (2009). The reproduction of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *Proceedings of the zoological society of London*, 114: 1-45.

- BREWER, N.R. (2006). Historical special topic overview on rabbit comparative biology: biology of the rabbit. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 45: 8-24.
- CHAN, H.C., HE, Q., AJONUMA, L.C., and WANG, X.F. (2007). Epithelial ion channels in the regulation of female reproductive tract fluid microenvironment: implications in fertility and infertility. *Acta Physiologica Sinica*, 59: 495-504.
- CHENG, H., DOOLEY, M., HOPKINS, S., ANDERSON, L., YIBCHOK-ANUN, S. and HSU, W. (1999). Development of rabbit embryos during 96-h period of in vitro culture after superovulatory treatment under conditions of elevated ambient temperature. *Animal Reproduction Science*, 56: 279-290.
- CHRETIEN, F.C. (1989). The saga of human spermatozoa throughout the jungle of the female genital tract. *Progress in Clinical and Biological Research*, 296: 263-272.
- CORTELL, C., SALVETTI, P., JOLY, T. and VIUDES DE CASTRO, M.P. (2014). Effect of different superovulation stimulation protocols on adenosine triphosphate concentration in rabbit oocytes. *Zygote*, 23: 507-513.
- CORTELL, C., VICENTE, J.S., MOCÉ, E., MARCO-JIMÉNEZ, F. and VIUDES DE CASTRO, M.P. (2010). Efficiency of repeated In Vivo oocyte and embryo recovery after rhFSH treatment in rabbits. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 155-159.
- DARSZON, A., LABARCA, P., NISHIGAKI, T. and ESPINOSA, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews*, 79: 481-510.
- DAVIES, N.B., KREBS, J.R. and WEST, S.A. (2012). Sexual selection, sperm competition and sexual conflict, en: *An introduction to behavioural ecology*, 4^a Ed. Editorial Wiley-Blackwell. New Jersey, 179-222.
- DEVROEY, P., FAUSER, B.C., PLATTEAU, P., BECKERS, N.G., DHONT, M. and MANNAERTS, B.M. (2004). Induction of multiple follicular development by a single dose of long-acting recombinant follicle-stimulating hormone (FSH-CTP, Coriotropin Alfa) for controlled ovarian stimulation before in vitro fertilization. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89: 2062-2070.
- DONALDSON, L.E. and WARD, D.N. (1986). Effect of luteinising hormone on embryo production in superovulated cows. *Veterinary Record*, 119: 625-626.
- DONOGHUE, M.A., SONSTEGARD, S.T., KING, M.L., SMITH, J.E. and BURT, W.E. (1999). Turkey sperm mobility influences paternity in the context of competitive fertilization. *Biology of Reproduction* 61: 422-427.
- DRION, P.V., DE ROOVER, R., HOUTAIN, J.Y., MCNAMARA, E.M., REMY, B., SULON, J. and BECKERS, J.F. (2001). Increase of plasma eGC binding rate after administration of repeated high dose of eGC to cows. *Reproduction Nutrition Development*, 41: 207-215.
- DZIUK, J.P. (1996). Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. *Animal Reproduction Science*, 43: 65-88.
- ERTZEID, G. and STORENG, R. (1992). Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre and post implantation development in mice. *Journal of Reproductive Fertility*, 96: 149-155.

EUROPEAN UNION (EU). (2013). Seventh report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union, visto el 23 de Mayo de 2019. Accesible en:

<https://eur-lex.europa.eu/legal content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013DC0859&from=EN>

EVANS, M.I., SCHULMAN, J.D., GOLDEN, L. and MUKHERJEE, A.B. (1981). Superovulation-induced intrauterine growth retardation in mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 141: 433-435.

FADDY, M.J., GOSDEN, M.D. and GOSDEN, R.G. (2018). A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth. *Reproductive Biomedicine Online*, 36(4): 455-458.

FISHER, B., CHAVATTE-PALMER, P., VIEBAHN, C., NAVARRETE SANTOS, A. and DURANTHON, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144: 1-10.

FUJIMOTO, S., PAHLAVAN, N. AND DUKELOW, W.R. (1974). Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *Journal of Reproductive Fertility* 40: 177-181.

GAD, A., BESENFELDER, U., RINGS, F., GHANEM, N., SALILEW-WONDIM, D., HOSSAIN, M.M., TEFAYE, D., LONERGAN, P., BECKER, A., CINAR, U., SCHELLANDER, K., HAVLICEK, V. and HÖLKER, M. (2011). Effect of reproductive tract environment following controlled ovarian hyperstimulation treatment on embryo development and global transcriptome profile of blastocysts: implications for animal breeding and human assisted reproduction. *Human Reproduction*, 26 (3): 1693-1707.

GARCIA-VAZQUEZ, F.A., GADEA, J., MATÁS, C. and HOLT, W.V. (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology*, 18: 333-335.

GRAUR, D., DURET, L., and GOUY, M. (1996). Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*, 379 (6563): 333-335.

GREVE, T. and CALLESEN, H. (2001). Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reproduction Nutrition Development*, 41 (5): 451-459.

GRIMAL, A., SAFAA, H.M., SAENZ-DE-JUANO, M.D., VIUDES-DE-CASTRO, M.P., MEHAISEN, G., ELSAYED, D.A.A., LAVARA, R., MARCO-JIMENEZ F. and VICENTE, J.S. (2012). Phylogenetic relationship among four Egyptian and one Spanish rabbit populations based on microsatellite markers. *Proceedings, 10th World Rabbit Congress*: 177-181.

HAMMOND, J. (1937). Pregnancy and nutrition of the embryo in the rabbit. *School Science Review*, 72: 548-557.

HASHIMOTO, S., KIMURA, K., KURAMOCHI, T., AOYAGI, K., HIRAKO, M., KAWAGUCHI, M., IWATA, H., HIRAO, M., KITADA, K., HIRASAWA, K. and UEDA, M. (2007). Responsiveness of rabbits to superovulation treatment by a single injection of follicle-stimulating hormone with aluminium hydroxide gel. *Molecular Reproduction and Development*, 74: 1208-1212.

HOLT, W.V. and FAZELI, A. (2015). Do sperm possess a molecular passport? Mechanistic insights into sperm selection in the female reproductive tract. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 21: 491-501.

- HUFFEL, V. and ROUGER, P. (1999). Le polymorphisme de l'AND appliqué aux recherches de filiation, analyse de 877 cas. *Transfusion Clinique et Biologique*, 6: 236-244.
- HUNTER, R.H.F., PETERSEN, H.H. and GREVE, T. (1999). Ovarian follicular fluid, progesterone and Ca²⁺ ion influences on sperm release from the Fallopian tube reservoir. *Molecular Reproduction and Development*, 54: 283-291.
- JEFFREYS, A.J., MACLEOD, A., TAMAKI, K., NEIL, D.L. and MOSSEKTON, D.G. (1991). Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, 354: 204-209.
- KAFI, M. and MCGOWAN, M.R. (1997). Factors associated with variations in the superovulatory response in cattle. *Animal Reproduction Science*, 48: 137-157.
- KANAYAMA, K., SANKAI, T., NARAI, K., ENDO, T. and SAKUMA, Y. (1994). Simplification of superovulation induction by using polyvinylpyrrolidone as a solvent for FSH in rabbits. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56: 59-60.
- KAUFFMAN, R.D., SCHMIDT, P.M., RALL, W.F. and HOEG, J.M. (1998). Superovulation of rabbits with FSH alters in vivo development of vitrified morulae. *Theriogenology*, 50: 1081-1092.
- KENNELLY, J.J. and FOOTE, R.H. (1965). Superovulatory response of pre and postpubertal rabbits to commercially available gonadotropins. *Journal of Reproductive Fertility*, 9: 177-188.
- KOMSKY-ELBAZ, A., SAKTSIER, M. and ROTH, Z. (2018). Aflatoxin B1 impairs sperm quality and fertilization competence. *Toxicology*, 393: 42-50.
- KONISHI, I. (2006). Gonadotropins and ovarian carcinogenesis: a new era of basic research and its clinical implications. *International Journal of Gynecological Cancer*, 16: 16-22.
- LANG, D.R. and LAMOND, D.R. (1966). Some factors affecting the response of the immature mouse to pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. *Journal of Endocrinology*, 34: 41-50.
- LEESE, H.J. (2002). Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays*, 24: 845-849.
- LEESE, H.J., BAUMAN C.G., BRISON, D.R., MCEVOY, T.G. and STURMEY, R.G. (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Human Reproduction*, 14: 667-672.
- LEESE, H.J., STURMEY R.G., BAUMAN C.G. and MCEVOY, T.G. (2007). Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Human Reproduction*, 22: 3047-3050.
- LONDRA, L., MOREAU, C., STROBINO, D., BASHIN, A. and ZHAO, Y. (2016). Is the type of gonadotropin-releasing hormone suppression protocol for ovarian hyperstimulation associated with ectopic pregnancy in fresh autologous cycles for in vitro fertilization? *Fertility and Sterility*, 106: 666-672.
- MADDISON, J.W., RICKARD, J.P., BERNECIC, N.C., TSIKIS, G., SOLEILHAVOUP, C., LAVAS, V., COMBES-SOIA, L., HARICHAUX, G., DRUART, X., LEAHY, T. and DE GRAAF, S.P. (2017). Oestrus synchronisation and superovulation alter cervicovaginal mucus proteome of the ewe. *Journal of Proteomics*, 155: 1-10.

- MAMO, S., GAL, A.B., POLGAR, Z., and DINNYES, A. (2008). Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5f1 and validation of referee genes in rabbit oocyte and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology*, 9: 67.
- MAPARA, M., THOMAS, B.S. and BHAT, K.M. (2012). Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental Research Journal*, 9: 111-118.
- MARCO-JIMÉNEZ, F., VICENTE, J.S., LAVARA, R., BALASH, S. and VIUDES DE CASTRO, M.P. (2010). Poor prediction value of sperm head morphometry and litter size in rabbit *Reproduction of Domestic Animals*, 45: 118-123.
- MARKET-VELKER, B.A., ZHANG, L., MAGRI, L.S., BONVISSUTO, A.C. AND MANN, M.R.W. (2010). Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Human Molecular Genetics*, 19: 36-51.
- MEDVEDEV, S.P., SHEVCHENKO, A.I., MAZUROK, N.A. and ZHAKIAN, S.M. (2008). OCT4 and NANOG are the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. *Russian Journal of Genetics* 44(12): 1589-1608.
- MEHAISEN, G.M., VIUDES DE CASTRO, M.P., VICENTE, J.S. and LAVARA, R. (2006). In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*, 65: 1279-1291.
- MISHRA, A.K., KUMAR, A., SWAIN, D.K., YADAV, S. and NIGAM, R. (2018). Insights into pH regulatory mechanisms in mediating spermatozoa functions. *Veterinary World*, 11: 852-858.
- MITSUI, K., TOKUZAWA, Y., ITOH, H., SEGAWA, K., MURAKAMI, M., TAKAHASHI, K., MARUYAMA, M, MAEDA, M. AND YAMANAKA, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113: 631-642.
- MOUGEL, F., MOUNOLOU, J. and MONNEROT, M. (1997). Nine polymorphic microsatellites loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics*, 18: 58-71.
- MURAKAMI, H. and IMAI, H (1996). Successful implantation of in vitro cultured rabbit embryos after uterine transfer: a role for mucin. *Molecular Reproduction and Development*, 43: 167-170.
- NAKASHINI, T., ISOTANI, A., YAMAGUCHI, R., IKAWA, M., BABA, T., SUAREZ, S.S. and OKABE, M. (2004). Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biology of Reproduction*, 71: 959-965.
- NAPIER, R.A.N. (1961). Fertility in the male rabbit II. Variation in the percentage of eggs fertilized. *Journal of Reproductive fertility*, 2: 260-272.
- NICHOLS, J., ZEVNIK, B., ANASTASSIADIS, K., NIWA, H., KLEWE-NEBENIUS, D., CHAMBERS, I., SCHÖLER, H. and SMITH, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95: 379-391.
- O'DOHERTY, A.M., O'BRIEN, Y.M., BROWNE, J.A., WINGFIELD, M. and O'SHEA, L.C. (2018). Expression of granulosa cell microRNAs, AVEN and ATRX are associated with human blastocyst development. *Molecular Reproduction and Development*, 85: 836-845.
- O'REILLY, P.J., GRAVES, C.N. and DZIUK, P.J. (1972). Heterospermic insemination of rabbit semen as a means of evaluating techniques of semen handling. *Reproduction*, 29: 49-56.

- OKABE, M. (2015). Mechanisms of fertilization elucidated by gene-manipulated animals. *Asian Journal of Andrology*, 17: 646-652.
- ORTEGA, I., GARCÍA-VELASCO, J.A. and PELLICER, A. (2018). Ovarian manipulation in ART: going beyond physiological standards to provide best clinical outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35: 1751-1762.
- OXLEY, J.A., ELLIS, C.F., MCBRIDE, A. and MCCORMICK, W.D. (2016). A review of handling methods of rabbits within pet, laboratory and veterinary contexts. *De la conferencia UFAW - Recent advances in animal welfare science*. (York, UK). 1 pp.
- PACEY, A.A., HILL, C.J., SCUDAMORE, I.W., WARREN, M.A., BARRATT, C.L. and COOKE, I.D. (1995). The interaction in vitro of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube. *Human Reproduction*, 10: 360-366.
- PARRISH, J.J. and FOOTE, R.H. (1985). Fertility differences among male rabbits determined by heterospermic insemination of fluorochrome-labelled spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 33: 940-949.
- PARVEX, R. (1982). *Etude compare du développement in vitro, in vivo et après congélation d'embryos du lapin produits avec ou sans superovulation*. Tesis doctoral en Ciencia Animal. Université Pierre et Marie Curie (Paris), 2: 260-272.
- PEREZ-RUIZ, I., MEJIDE, S., HERNÁNDEZ, M.L., NAVARRO, R., LARREATEGUI, Z., FERRANDO, M., RUIZ-LARREA, M.B. and RUIZ-SANZ, J.I. (2018). Analysis of protein oxidative modifications in follicular fluid from fertile women: natural versus stimulated cycles. *Antioxidants*, 7: 176.
- PFÄFFL, M.W. (2004). Quantification Strategies in Real-Time PCR, en: *A-Z Quantitative PCR*. S.A. Bustin. International University Line. La Jolla: 87-112.
- POLLARD, J., PLANTE, C. AND BRINGANS, M.J. (2007). Applications of embryo biotechnologies in farmed cervids, en: *Current therapy in large animals theriogenology*, 2^a Ed. Editorial Elsevier. Amsterdam, 991-1000.
- PUSCHEL, B., DANIEL, N., BITZER, E., BLUM, M., RENARD, J.P. and VIEBAHN, C. (2010). The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): a model for mammalian reproduction and early embryology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010.
- QUENEY, G., FERRAND, M., WEISS, S., MOUGEL, F. and MONNEROT, M. (2001). Stationary distributions of microsatellite loci between divergent populations of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Molecular Biology and Evolution*, 18: 2169-2178.
- REMYA, K.S., SIGIMOL, J., LAKSHMI, P.K. and AKHILA, S. (2010). Microsatellites in various areas of research. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2: 141-143.
- RICO, C., RICO, I. and WEBB, N. (1994). Four polymorphic microsatellite loci for the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics*, 25: 367.
- ROBL, J.M. and DZIUK, J.P. (1988). Comparison of heterospermic and homospermic inseminations as measures of male fertility. *Journal of Experimental Zoology*, 245: 97-101.
- ROCHE APPLIED SCIENCE (2001). Technical note No. LC13. *Roche Diagnostics GmbH*. Visto el 10 de junio de 2019. Accesible en:

<https://www.gene-quantification.de/roche-rel-quant.pdf>

- ROSE, M.P., GAINES DAS, R.E. and BALEN, A.H. (2000). Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocrine Reviews*, 21: 5-12.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. and ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- SAKURAI, T., WATANABE, S., KAMIYOSHI A., SATO, M and SHINDO, T. (2014). A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnology*, 14: 69
- SALVETTI, P., THEAU-CLÉMENT, M., BECKERS, J.F., HURTAUD, J., GUÉRIN, P., NETO, V. FALIÈRES, J. and JOLY, T. (2007). Effect of the luteizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67: 1185-1193
- SCHNAKENBERG, S.L., SIEGAL, M.L and BLOCH QAZI, M.C. (2012). Oh, the places they'll go female sperm storage and sperm precedence in *Drosophila melanogaster*. *Spermatogenesis*, 2: 224-235.
- SHARIF, K., and OLUFOWOBI, O. (2006). The structure, chemistry and physics of human cervical mucus, en: *The Cervix*. 2nd ed. Editorial Blackwell Publishing Ltd; Nueva Jersey, EE UU, p. 157-168.
- SOUTHERN, H.N. (1940). The ecology and population dynamics of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Annals of Applied Biology*, 27: 509-526.
- STAHLBERG, R., HARLIZIUS, B., WEITZE, K.F. and WABERSKI, D. (2000). Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology*, 53: 1365-1373.
- SUAREZ, S.S. (2015). Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell and Tissue Research*, 363: 185-194.
- SUN, F., BAHAT, A., GAKAMSKY, A., GIRSH, E., KATZ, N., GIOJALAS, L.C., TUR-KASPA, I. and EISENBACH, M. (2005). Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cell secrete sperm chemoattractants. *Human Reproduction*, 20: 761-767.
- SURRIDGE, A.K., BELL, D.J., RICO, C. and HEWITT, G.M. (1997). Polymorphic microsatellites loci in the European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other lagomorph species. *Animal Genetics*, 28: 302-305.
- TRELOAR, A.F., SCHABDACH, D.G., SANSING, S. and KELLER, L.S. (1997). Superovulation of New Zealand white rabbits by continuous infusion of folliclestimulating hormone, using micro-osmotic pump. *Laboratory Animals Science*, 47: 313-316.
- USHA, A.P., SIMPSON, S.P. and WILLIAMS, J.L. (2009). Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Animal Genetics*, 112: 191-204.
- UYSAL, F., OZTURK, S. and AKKOYUNLU, G. (2017). Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35: 503-513.
- VAN DER AUWERA, I. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human Reproduction*, 16: 1237-1243.

- VAN DER AUWERA, I., PIJNENBORG, R. and KONINCKX, P.R. (1999). The influence of in vitro culture versus stimulated and untreated oviductal environment on mouse embryo development and implantation. *Human Reproduction*, 14: 2570-2574.
- VICENTE, J.S., LAVARA, R., MARCO-JIMÉNEZ, F. and VIUDES DE CASTRO, M.P. (2011). Detrimental effect on availability of busserelin acetate administrated in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76: 1120-1125.
- VICENTE, J.S., VIUDES DE CASTRO, M.P., CEDANO-CASTRO, J.I. and MARCO-JIMÉNEZ, F. (2018). Cryosurvival of rabbit embryos obtained after superovulation with corifollitropin alfa with or without LH. *Animal Reproduction Science*, 192: 321-327.
- VICENTE, J.S., VIUDES DE CASTRO, M.P., LAVARA, R. and MOCÉ, E. (2004). Study of fertilising capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in rabbit using DNA markers. *Theriogenology*, 61: 1357-1365.
- VIUDES DE CASTRO, M.P., CORTELL, C., MOCÉ, E., MARCO-JIMÉNEZ, F., JOLY, T. and VICENTE, J.S. (2009). Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology*, 72: 655-662.
- VIUDES DE CASTRO, M.P., MARCO-JIMÉNEZ, F., CEDANO-CASTRO, J.I. and VICENTE, J.S. (2017). Effect of corifollitropin alfa supplemented with or without LH on ovarian stimulation and embryo viability in rabbit. *Theriogenology*, 98: 68-74.
- VIUDES DE CASTRO, M.P., MARCO-JIMÉNEZ, F., MAS-PELLICER, A., GARCÍA-DOMÍNGUEZ, X., TALAVÁN, A.M. and VICENTE, J.S. (2019). A single injection of corifollitropin alfa supplemented with hcg increase follicular recruitment and transferable embryos in the rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*. (Aceptado para publicación, doi:10.1111/rda.13411)
- VIUDES DE CASTRO, M.P., POMARES, A., SAENZ DE JUANO I RIBES, M.D., MARCO-JIMÉNEZ, F. and VICENTE, J.S. (2015). Effect of luteinizing hormone on rabbit ovarian superstimulation and embryo developmental potential. *Theriogenology*, 84: 446-451.
- WALTON, E.A., HUNTLEY, S., KENNEDY, T.G., and ARMSTRONG, D.T. (1982). Possible causes of implantation failure on superovulated immature rats. *Biology of Reproduction*, 27: 847-852.
- WANG, S., TANG, X., NIU, Y., CHEN, H., LI, B., LI, T., ZHANG, X., HU, Z., ZHOU, Q. and JI, W. (2007). Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25: 481-489.
- WILLIAMS, M., BARRATT, C.L., HILL, C.J., WARREN, M.A., DUNPHY, B. and COOKE, I.D. (1992). Recovery of artificially inseminated spermatozoa from the fallopian tubes of a woman undergoing total abdominal hysterectomy. *Human Reproduction*, 7: 506-509.
- WILSON, J.M., JONES, A.L., MOORE, K., LOONEY, C.R. and BONDIOLI, K.R. (1993). Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle-stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*, 33: 71-82.
- ZEVEREN, V.A., PEELMAN, L., WEGHE, V. A. and BOUQUET, Y. (1995). A genetic study of four Belgian pig populations by means of seven microsatellite loci. *Animal Breeding Genetics*, 112: 191-204.
- ZHANG, S. and CUI, W. (2014). SOX2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6: 305-311.