

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



TRABAJO FINAL DE GRADO

**Efecto del sobrepeso sobre la fertilidad en el
modelo conejo**

Grado en Biotecnología

ALUMNA: ALMUDENA MORENO MORENO-CID
TUTORA: CARMEN NATURIL ALFONSO

Curso académico 2018/2019
Valencia, Julio 2019



Título del TFG: Efecto del sobrepeso sobre la fertilidad en el modelo conejo**Alumna:** Dña. Almudena Moreno Moreno-Cid**Tutora Académico:** Prof. Dña. Carmen Naturil Alfonso

Valencia, Julio 2019

RESUMEN

Actualmente, la obesidad y el sobrepeso constituyen uno de los grandes problemas de salud en todo el mundo, considerados como una epidemia mundial. Son muchas las comorbilidades asociadas a esta enfermedad, pero en las últimas décadas se ha hecho especial énfasis en los efectos negativos que pueden provocar en la función reproductiva, especialmente en la mujer. Estos se asocian a problemas de fertilidad, anovulación, una menor calidad ovocitaria y complicaciones durante el desarrollo embrionario, entre otros. De la misma forma, la obesidad materna también afecta a la capacidad espermática para llevar a cabo la fecundación, dando lugar a una dominancia entre los machos en función del ambiente uterino resultado de la condición corporal.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del sobrepeso materno en la fertilidad, la calidad embrionaria de blastocitos de 6 días y en la tendencia en la selección espermática. Con este fin, se generaron dos grupos experimentales de hembras sometidas a distintas condiciones alimenticias durante 15 semanas: (i) alimentación restringida (grupo control) y (ii) alimentación *ad libitum* (grupo sobrepeso). Durante este periodo, se llevó a cabo un control semanal del peso de las hembras de cada grupo. Tras las 15 semanas de alimentación diferencial, las hembras de ambos grupos fueron inseminadas. Para abordar los objetivos del presente trabajo, por una parte, se determinó la respuesta ovulatoria y éxito en la fecundación, además de analizarse la expresión génica en embriones de 6 días de los genes de pluripotencialidad OCT4, SOX2 y NANOG, como marcadores de la calidad embrionaria. Por otra parte, se asignaron los parentales candidatos a todos los embriones recuperados para estudiar la selección espermática.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la tasa de ovulación ni de recuperación embrionaria, aunque sí en la supervivencia de los embriones, siendo mayor en el grupo de hembras control. En cuanto a la expresión génica de los embriones, no se observó efecto de sobrepeso en la calidad embrionaria. Por último, los resultados de paternidad tampoco mostraron ninguna tendencia significativa en la selección espermática.

Por lo tanto, los resultados de este trabajo muestran que las hembras con sobrepeso únicamente presentan menor supervivencia embrionaria, sugiriendo que el estado de sobrepeso en la hembra podría afectar a la calidad ovocitaria y al ambiente uterino, reduciendo el éxito de la fecundación.

PALABRAS CLAVE

Sobrepeso; fertilidad; expresión génica; asignación paternidad; selección espermática; conejo

Title: Effect of overweight on fertility in rabbit animal model.

ABSTRACT

Nowadays, obesity and overweight are one of the biggest health problems in the world, and they are considered a global epidemic. There are many comorbidities associated with this disease, but in recent decades there has been special emphasis on the negative effects that can lead on reproductive function, especially in women. These are associated with fertility problems, anovulation, lower oocyte quality and complications during embryonic development, among others. In the same way, maternal obesity also affects the sperm ability to carry out fertilization, giving rise to a dominance between the males depending on the uterine environment as a result of the corporal condition.

The objective of this work was to evaluate the effect of maternal overweight on fertility, the embryonic quality of 6-day blastocysts and on the tendency in sperm selection. To this end, two experimental groups of females subjected to different dietary conditions for 15 weeks were generated: (i) restricted feeding (control group) and (ii) ad libitum feeding (overweight group). During this period, a weekly control of the weight of the females of each group was carried out. After 15 weeks of differential feeding, the females of both groups were inseminated. To address the objectives of this work, the ovulatory response and fertilization success were determined. In addition, the gene expression in 6-day embryos for OCT4, SOX2 and NANOG genes of pluripotentiality, as markers of embryo quality, was analyzed. Moreover, candidate parents were assigned to all recovered embryos in order to study sperm selection.

The results showed no significant differences in ovulation rate or embryo recovery rate, although higher embryonic survival was found for the group of control females. Regarding to embryo gene expression, no overweight effect on embryo quality was observed. Finally, the paternity results did not show any significant tendency in the sperm selection.

Therefore, the results of this work show that overweight females only have lower embryonic survival, and it suggests that the overweight state in females could affect the oocyte quality and uterine environment, reducing the success of fertilization.

KEYWORDS

Overweight; fertility; gene expression; paternity assignment; sperm selection; rabbit

AGRADECIMIENTOS

En este trabajo final quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado no solo en este último año, sino a lo largo de toda la carrera.

En primer lugar, a mi tutora Carmen, por su disponibilidad, sus consejos y paciencia en todo momento, y por invertir su tiempo en este trabajo. Agradecer también a David, por habernos ayudado en toda la parte molecular, por haber cuidado cada detalle de nuestro trabajo en el laboratorio y haber tenido toda la paciencia posible en los momentos más difíciles. A Paco y Jose, por transmitir sus conocimientos e ilusión por la investigación. A Ximo, por ofrecer siempre su ayuda, por su cercanía, por sus ratitos de charlas motivadoras y comprender nuestro agobio, junto con Luis, amenizándonos siempre las horas en granja. Y como no a Amparo, por tener todo tan bien organizado siempre y dedicar su tiempo a ello.

También quería agradecer a toda la gente que me ha acompañado durante estos cuatro años, especialmente a Josep y Belén, con quien he compartido todo desde el primer día de clase hasta el último momento dedicado a este trabajo, y que se han convertido en lo mejor de esta etapa. Por supuesto, al resto de equipo de trabajo, Jorge, Noelia, Laura y Paula, por haber creado una familia durante estos meses, por los consuelos, los descansos al sol, comidas de tupper y por haber hecho más llevaderas las infinitas horas en el laboratorio. Jorge y Josep, no hemos podido formar mejor equipo.

A todas mis amigas y amigos, por haber confiado en mi y haberme recordado siempre que era capaz de conseguir todo lo que me propusiera, especialmente a ti, Silvia, por ser dos en una y una en dos, por complementarme y valorarme, por empujarme hacia delante cuando he estado a punto de mirar hacia atrás y por dejarme compartir todo contigo.

Por último, agradecer a mi familia, sobre todo a mis padres, por haberme dado la oportunidad de hacer siempre lo que deseo, por transmitirme las ganas de luchar por conseguirlo, por todo el apoyo y comprensión en los momentos más duros. Todo esto es vuestro también.

Gracias a todos.

ÍNDICES

ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS	III

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. Conejo como modelo animal para el estudio en reproducción humana	1
1.3. Efectos del sobrepeso durante la reproducción	3
1.3.1. Formación de gametos.....	3
1.3.2. Fecundación, implantación y gestación.....	5
1.4. Efectos de los tratamientos de superovulación	7
1.5. Potencial de fertilidad en el espermatozoides.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
3.1. Diseño experimental del estudio	10
3.2. Animales	11
3.3. Obtención de embriones	12
3.3.1. Tratamiento de superovulación.....	12
3.3.2. Inseminación artificial	12
3.3.3. Recuperación de embriones.....	14
3.4. Análisis de paternidad	15
3.4.1. Toma de muestra sanguínea y extracción de DNA de los parentales.....	16
3.4.2. PCR de los microsatélites	17
3.4.3. Secuenciación de los microsatélites	18
3.4.4. Asignación del parentesco de los embriones	19
3.5. Análisis de expresión génica de los embriones.....	19
3.5.1. Extracción de RNA y retrotranscripción.....	19
3.5.2. Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (RT-qPCR)	19
3.7. Análisis estadísticos.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Seguimiento del peso de las hembras control y sobrepeso	22
4.2. Análisis de parámetros seminales para la mezcla heteroespérmica	23
4.3. Tasas de ovulación, recuperación de embriones y peso de ovarios	23
4.4. Expresión génica de los embriones	25
4.5. Asignación de parentescos	26
5. DISCUSIÓN.....	28
6. CONCLUSIONES.....	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) utilizado en investigaciones biotecnológicas.
- Figura 2** Diseño experimental del estudio. Asignación de paternidad y análisis de expresión génica.
- Figura 3** Línea de conejo de origen California empleada en el estudio.
- Figura 4** Esquema de los grupos de estudio empleados.
- Figura 5** Cámara cuentaglobulos para determinar la concentración espermática.
- Figura 6** Inseminación artificial con cánula.
- Figura 7** Embriones recuperados en estadio de blastocistos.
- Figura 8** Ovarios con cuerpos lúteos.
- Figura 9** Extracción de sangre de la arteria central de la oreja.
- Figura 10** *Nanodrop 2000* de la empresa *Thermo Fisher Scientific*®.
- Figuras 11-12** Ejemplos de picos en la secuenciación de los microsatélites.
- Figura 13** Seguimiento semanal del peso para hembras control y sobrepeso.
- Figura 14** Diferencias en el peso semanal entre hembras sobrepeso y control.
- Figura 15** Tasa de ovulación media para hembras control y sobrepeso.
- Figura 16** Tasa de recuperación media para hembras control y sobrepeso.
- Figura 17** Tasa de supervivencia embrionaria o porcentaje de embriones recuperados para hembras control y sobrepeso.
- Figura 18** Peso de los ovarios promedio para hembras control y sobrepeso.
- Figura 19** Expresión génica de los genes *SOX2*, *OCT4*, *NANOG* para hembras control y sobrepeso.
- Figura 20** Parentales asignados a los embriones de ambos grupos de estudio por *Cervus*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características de los cebadores de los microsatélites empleados en la PCR.
Tabla 2	Composición de cada mix empleada en la PCR.
Tabla 3	Programas de tiempos y temperaturas de PCR para cada mix.
Tabla 4	Programa de temperaturas y tiempos para la preparación del cDNA.
Tabla 5	Características de los cebadores empleados en la RT-qPCR.
Tabla 6	Programa de tiempos y temperaturas de la RT-qPCR.
Tabla 7	Análisis de los diferentes parámetros seminales para cada macho y su significación.
Tabla 8	Alelos establecidos para cada microsatélite tras su secuenciación.

ABREVIATURAS

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

ANOVA: Análisis de la varianza

BCF: Frecuencia de batido de la cabeza

BSA: Bovine serum albumine (Albúmina sérica bovina)

cdNA: complementary DNA (ADN complementario)

DNA: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DPBS: Dulbecco's phosphate buffer saline (Tampón fosfato salino de Dulbecco)

eCG: Gonadotropina coriónica equina

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FSH: Hormona folículo estimulante

GLM: Modelo lineal general

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

H2AFZ: Gen H2A histone family member Z

hCG: Gonadotropina coriónica humana

HPO: Eje hipotalámico-hipofisario-ovárico

IL-6: Interleucina-6

IMC: Índice de Masa Corporal

LIN: Índice de linealidad

mRNA: messenger RNA

MSY2: Y-box binding protein 2

OCT4: Gen octamer-binding transcription factor-4

OMS: Organización Mundial de la Salud

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

PF: Primer forward

PR: Primer reverse

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

rFSH-CTP: Corifolitropina alfa

RNA: ribonucleic acid

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa

SHBG: Globulina fijadora de hormonas sexuales

SOX2: Gen Sex determining Region Y-box 2

STR: Índice de rectitud

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TO: Tasa de ovulación

TR: Tasa de recuperación

VCL: Velocidad curvilínea

VAP: Velocidad media

VSL: Velocidad rectilínea

WOB: Índice de oscilación

1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad es una enfermedad crónica definida por una acumulación anormal o excesiva general de grasa en el organismo, asociada a numerosos efectos perjudiciales para la salud (OMS, 2019). Existe una clasificación actual propuesta por la OMS dependiente del índice de masa corporal (IMC), que relaciona el peso (kg) y el cuadrado de la altura (m²), de modo que, si su valor es igual o superior a 30 kg/m², el individuo es considerado obeso (MORENO, 2012). Actualmente, la obesidad es considerada como uno de los mayores problemas de salud en el mundo, pues es un factor de riesgo importante para otras enfermedades crónicas (MALO-SERRANO ET AL, 2017), llegando a convertirse en una epidemia mundial (MÖNCKEBERG Y MUZZO, 2015). La consideración de la obesidad como epidemia surge del aumento de su prevalencia en todo el mundo desde la década de los ochenta del siglo XX hasta ahora, con un aumento significativo en los años de este nuevo siglo (SODERLUND, 2016).

Según ARTEAGA (2012), son numerosas las comorbilidades asociadas al problema de la obesidad y sobrepeso, dependiendo del tipo de alteración. Entre ellas se encuentran las debidas a alteraciones metabólicas, como la diabetes tipo II, dislipidemias, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, hígado graso y ovario poliquístico. Por otro lado, se encuentran aquellas producidas por alteraciones mecánicas, como pueden ser la hipoventilación, apnea del sueño, insuficiencia cardíaca o la osteoartritis. A éstas también se suman las enfermedades psico-sociales, no menos importantes, como pueden ser la depresión, ansiedad, discriminación social... Otro campo en el que el problema de la obesidad ha cobrado gran importancia es el cáncer. Se conoce que está asociado a diversos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, de endometrio, ovárico, colorectal, pancreático y de próstata (ARTEAGA, 2012).

En las últimas décadas, se ha hecho especial énfasis en los efectos adversos que puede provocar la obesidad en la función reproductiva, especialmente en mujeres. Existe un número considerable de mujeres en edad reproductiva que presentan problemas a la hora de concebir o de llevar a término un embarazo (YATSENKO Y RAJKOVIC, 2019), siendo gran parte de ellas clasificadas como obesas o con sobrepeso (HOHOS Y SKAZNIK-WIKIEL, 2017). De hecho, los hábitos y estilos de vida que están presentes en la sociedad, entre los que se encuentra la ingesta excesiva de grasas, es uno de los factores que pueden provocar infertilidad, especialmente en mujeres en edad fértil (CORDIER ET AL., 2013; YATSENKO Y RAJKOVIC, 2019).

1.2. Conejo como modelo animal para el estudio en reproducción humana

Después del ratón y la rata, el conejo es el tercer mamífero más utilizado como modelo animal en el campo de la investigación en la Unión Europea (FISCHER ET AL., 2012). El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) (Figura 1) es principalmente utilizado en la producción de antisueros, farmacología y toxicología, así como en investigación biomédica, ya que comparte numerosas enfermedades transmisibles y no transmisibles con los humanos, como cataratas, arterioesclerosis, osteoporosis, cardiomiopatías (CAÑÓN, 2015), incluso es un modelo más

utilizado para el estudio de trastornos metabólicos inducidos por la dieta y la resistencia a la insulina (ZHENG ET AL., 2009).



Figura 1. Conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) utilizado en investigaciones biotecnológicas.

Dentro de los numerosos estudios en los que es empleado, cabe destacar la investigación biotecnológica, tanto genética como reproductiva (CORTELL, 2014). El conejo presenta una serie de características que hacen de él un buen modelo animal para este tipo de estudios, entre ellas que su embriología comparte numerosos aspectos con el ser humano (FISCHER, 2017); es una especie cuya cronología del desarrollo y etapas de gestación se conocen con exactitud; hasta los 6 días poscoito es posible recuperar del útero los blastocistos, siendo éstos de un tamaño que ronda los 2 mm y, por tanto, fácilmente manejables y susceptibles de manipulación, lo cual resulta una gran ventaja (FISCHER, 2017). El hecho de presentar un ciclo reproductivo corto y conocer el momento preciso de ovulación del animal permite identificar y documentar el momento del desarrollo, la aposición y la implantación del embrión en el útero materno, facilitando así numerosos estudios como pueden ser nutricionales, ambientales o químicos en el campo de la biotecnología reproductiva (HOFFMAN ET AL., 1998; TAO Y NIEMANN, 2000; LEE Y DEMAYO, 2004).

Por otra parte, el conejo es una de las pocas especies de mamíferos cuya ovulación es inducida por la estimulación sensorial producida en el apareamiento (BAKKER Y BAUM, 2000). Esto resulta una ventaja a la hora de programar una gestación para llevar a cabo un estudio, ya que no presentan períodos reproductivos específicos, sino que son susceptibles durante todo el año. A su vez, esto favorece en el animal una rápida capacidad para reproducirse, pues la hembra es capaz de volver a aparearse a pocas horas de haber dado a luz. De especial interés resulta que, en caso de no haber apareamiento, la ovulación puede ser desencadenada artificialmente por un tratamiento hormonal (FISCHER ET AL., 2012).

Además de las anteriores características reproductivas que presenta el conejo, se ha de tener en cuenta que es un animal de pequeño tamaño, fácil de manejar y cuyo mantenimiento es de un coste relativamente económico. Se convierte, por tanto, en uno de los mamíferos más utilizados en experimentación animal (FISCHER ET AL., 2012).

1.3. Efectos del sobrepeso durante la reproducción

La obesidad y el sobrepeso no solo predisponen a las mujeres jóvenes a una serie de enfermedades crónicas, sino que también aumenta el riesgo de infertilidad, disfunción menstrual, anovulación, problemas en fecundación e implantación, complicaciones durante el desarrollo embrionario, aborto espontáneo, e incluso alteraciones congénitas, debido a los diversos cambios metabólicos que tienen lugar durante la gestación (SODERLUND, 2016; HOHOS Y SKAZNIK-WIKIEL, 2017). De la misma forma, las técnicas de reproducción asistida están siendo menos efectivas en estos casos (HOHOS Y SKAZNIK-WIKIEL, 2017), por lo que se está convirtiendo en un problema importante para la sociedad.

1.3.1. Formación de gametos

El metabolismo energético y fertilidad femenina están estrechamente conectados y regulados de forma recíproca (CHANDRASENKARAN Y NEAL-PERRY, 2017). Un alto consumo de grasas, haya o no desarrollo de obesidad, afecta a la funcionalidad del eje hipotalámico-hipofisario-ovárico (HPO) (HOHOS Y SKAZNIK-WIKIEL, 2017), pudiendo derivar en problemas a la hora de formar los gametos, ya que los niveles de hormonas y/o nutrientes pueden alterar las condiciones óptimas del medio en el que éstos se desarrollan (BERMEJO-ALVAREZ ET AL., 2012).

Es muy común que las mujeres obesas y con sobrepeso presenten una disfunción metabólica caracterizada por una hipercolesterolemia y aumento de la concentración de ácidos grasos no esterificados, hiperglucemia y resistencia a la insulina (CHANDRASENKARAN Y NEAL-PERRY, 2017). La insulina es una hormona muy estudiada en este campo debido a sus efectos en los eventos reproductivos, como es la esteroidogénesis ovárica, la foliculogénesis y la fisiología de la ovulación (ZAIN Y NORMAN, 2008). Una alta concentración de insulina aumenta la sensibilidad de las células gonadótropas a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y, por tanto, estimula la formación de andrógenos por parte de las células teca del ovario e inhibe la liberación hepática de la globulina transportadora de andrógenos (SHBG), provocando un aumento de la concentración de testosterona libre circulante; esto promueve el hiperandrogenismo y la posibilidad de alteraciones en los ciclos menstruales y ovulatorios (MANRIQUE, 2017). Este aumento de los niveles de estrógenos y andrógenos resultan en el cese del crecimiento del folículo y en una anovulación crónica (DAĞ Y DILBAZ, 2015).

Por otra parte, el tejido adiposo blanco, además de almacenar energía, es un importante órgano endocrino encargado de regular la glucosa y el metabolismo de las grasas, la inflamación y la reproducción (CHANDRASENKARAN Y NEAL-PERRY, 2017). De hecho, se ha demostrado que un exceso de este órgano aumenta el riesgo de trastornos en la función reproductiva (DAĞ Y DILBAZ, 2015). A medida que el tejido graso aumenta, se genera un estado de hipoxia en las células adiposas que deriva en una respuesta inflamatoria, induciendo así la secreción de adipocitoquinas, como son la leptina, adiponectina, resistina y grelina implicadas en la regulación de funciones importantes en los órganos reproductores (SODERLUND, 2016). En esta línea, en mujeres obesas también es común la resistencia a las leptinas. Éstas tienen un papel en el control de la liberación de gonadotropinas, pero no cuando se encuentran en exceso (BERMEJO-ALVAREZ ET AL., 2012). Una concentración elevada de leptinas provoca la inhibición de

la síntesis y secreción de la GnRH, así como la esteroidogénesis ovárica. Además, la presencia de receptores para la leptina en las células foliculares puede desencadenar alteraciones en el desarrollo del folículo y consecuentemente alteraciones en la formación de los óvulos (SODERLUND, 2016).

De esta forma, un aumento crónico de los niveles de glucosa, insulina y adipocitoquinas lleva consigo una serie de efectos perjudiciales como es el estrés oxidativo, disfunción endotelial y alteraciones en el metabolismo lipoproteico (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ ET AL., 2008), que derivan en un estado inflamatorio crónico y una disfunción endocrina, pudiendo afectar a la edad de aparición de la primera menstruación, el desarrollo del síndrome de ovario poliquístico y por consiguiente a una subfertilidad. Además, una alta concentración de triglicéridos en el líquido folicular produce un estrés oxidativo seguido de toxicidad en los ovocitos, a lo que se suma una disfunción en las mitocondrias y apoptosis en las células de la granulosa (CHANDRASENKARAN Y NEAL-PERRY, 2017). En esta misma línea, numerosos estudios parecen concluir que una dieta alta en grasas da lugar a un mayor porcentaje de apoptosis folicular, un menor número y tamaño de ovocitos ovulados y retraso en la maduración (JUNGHEIM ET AL., 2010), así como una calidad pobre de ovocitos postovulatoria (MINGE ET AL., 2008). Además, algunos estudios han demostrado que una forma de estimular la producción de ovocitos y su calidad es mediante un régimen restringido a las necesidades energéticas en conejo (MAHMOUD ET AL., 2006; DAUD ET AL., 2012). De hecho, estudios previos como el de NATURIL-ALFONSO ET AL. (2017) observaron que un régimen de restricción de la alimentación en una línea de conejo determinada afectaba a la expresión génica de los óvulos, alterando los niveles de expresión del gen *MSY2*, una proteína involucrada en procesos relevantes de maduración y crecimiento de los ovocitos, cuyos niveles reducidos se han relacionado con una menor maduración y activación del ovocito.

Por otra parte, en muchos casos, los hombres con sobrepeso también han demostrado ser un factor de riesgo a la hora de conseguir llevar a cabo el embarazo (DAĞ ET AL., 2015). En esta línea, existen evidencias que relacionan trastornos metabólicos que afectan al tejido adiposo con la deficiencia de andrógenos, especialmente la testosterona (DE MADDALENA ET AL., 2012). La obesidad es considerada una causa directa en la modificación de los niveles de hormonas, pues está asociada a niveles bajos de testosterona y SHBG (globulina fijadora de hormonas sexuales) (TSAI ET AL., 2004; LI ET AL., 2019). La testosterona es la hormona más importante en los machos, y ejerce un papel clave en el desarrollo testicular, la espermatogénesis y la función normal de masculinización (ZHAO ET AL., 2014). Por otra parte, los niveles reducidos de SHBG conllevan una mayor disponibilidad de testosterona para ser convertida en estradiol. El aumento de estradiol con respecto a la testosterona es causa de infertilidad masculina, pudiendo tener un efecto directo en el ambiente del testículo, viéndose reflejado en una reducción de la movilidad y concentración de los espermatozoides (AKINGBEMI, 2005). El hecho de que el espermatozoide sea potencialmente fértil depende de su madurez en el epidídimo, un órgano andrógeno-dependiente, por lo que cualquier cambio hormonal estaría repercutiendo en la correcta funcionalidad de éste y, por tanto, del espermatozoide. Además, un almacenamiento excesivo de grasa en el escroto puede provocar un aumento de temperatura en el ambiente donde se desarrollan los gametos, viéndose afectada la producción de los espermatozoides a causa de un estrés oxidativo (RUIZ ET AL., 2016).

Actualmente, existe cierta controversia en la posible correlación entre la cantidad de tejido adiposo en el cuerpo y los parámetros de calidad del semen, como es el número de espermatozoides, la morfología, la concentración y la integridad del DNA. Algunos de estos estudios han demostrado una correlación negativa directa entre la producción espermática (volumen, concentración y número de espermatozoides) y la obesidad en conejo (BELLOC ET AL., 2014; TSAO ET AL., 2015), mientras que otros consideran que no son suficientes las evidencias existentes para confirmar dicha asociación (MACDONALD ET AL., 2010; THOMSEN ET AL., 2014). Otros autores, como MARCO-JIMÉNEZ Y VICENTE (2017), solo han conseguido correlacionar el parámetro de concentración espermática con la obesidad, siendo ésta menor en conejos obesos. En el caso de humanos, también se han hecho estudios epigenéticos de metilación del DNA del esperma, cuyas alteraciones están asociadas con problemas de infertilidad (LAURENTINO ET AL., 2016). Se ha visto una correlación directa entre la obesidad y parámetros como una menor motilidad, menor concentración y una estructura alterada de la cromatina en el esperma (KORT, 2006).

1.3.2. Fecundación, implantación y gestación

Eventos posteriores a la formación de los gametos también se ven afectados por la obesidad y el sobrepeso, como es la fecundación, la receptividad uterina o la implantación del cigoto en el útero (SCHISTERMAN ET AL, 2014). Todavía no se conoce con exactitud el mecanismo fisiológico por el cual afectan la obesidad y el sobrepeso en estos puntos, pero la gran mayoría de estudios corroboran un efecto negativo de los mismos, y es probable que sea consecuencia del deterioro que suman diversos procesos (BREWER, 2010).

Existe una asociación entre el nivel de lípidos séricos en la pareja y el tiempo transcurrido hasta darse el embarazo, por lo que es considerado un factor de riesgo para la reducción de la fecundidad y el aumento del tiempo requerido para la implantación (SCHISTERMAN ET AL., 2014). Otro factor de riesgo en la implantación son las alteraciones del sistema de las leptinas, cuyo exceso puede afectar negativamente a la receptividad por parte del endometrio y, por consiguiente, inhibir la implantación (SODERLUND, 2016). Además, también se han asociado ciertos fallos en la implantación, en el desarrollo temprano del embrión e incluso pérdida del embarazo con una expresión aberrante de adiponectinas y sus receptores, presentes en la pituitaria de mamíferos, ovarios, útero y placenta, provocando cierta interferencia en la conexión embrión-útero (GOSMAN ET AL., 2006; ESINLER ET AL., 2008; LEVENS Y SKARULIS, 2008; KIM ET AL., 2011; CHANDRASEKARAN Y NEAL-PERRY, 2017). No obstante, aunque el endometrio desempeña un papel importante en estos procesos, otros estudios sugieren que el factor más limitante sea la baja calidad de los ovocitos (BREWER, 2010).

La obesidad y el sobrepeso son factores de riesgo importantes durante el periodo de gestación, pudiendo dar lugar a complicaciones como un parto prematuro, preeclampsia o hipertensión crónica, macrosomía fetal, retraso del crecimiento, traumatismo e hipoglucemia neonatal, diabetes gestacional, e incluso está considerada como principal causa de cáncer endometrial (ORTIZ-MENDOZA Y VELASCO-NAVARRO, 2013). Durante el desarrollo embrionario, la obesidad materna conlleva a un aumento significativo del riesgo a padecer macrosomía fetal o un feto grande para la edad gestacional hasta tres veces más alta de lo normal, así como alteraciones en el crecimiento plaquetario en fases tempranas de la gestación (MACLAUGHLIN ET

AL., 2005). Como se ha comentado anteriormente, la obesidad provoca un estado de estrés oxidativo crónico y un aumento de la inflamación, que pueden afectar a la expresión de genes responsables del desarrollo embrionario e incluso promover patrones anormales de apoptosis celular. Dicho aumento de inflamación supone una mayor cantidad de interleucinas, especialmente la IL-6 y TNF- α , las cuales pueden actuar de forma local cruzando la barrera de la placenta y regulando el desarrollo fetal, o a nivel sistémico, afectando a la sensibilidad a la insulina. A raíz de desarrollar la resistencia a la insulina, ésta puede pasar al útero, resultando en una predisposición en la descendencia a un aumento de la probabilidad de padecer diabetes tipo II durante la adolescencia y la edad adulta (SODERLUND, 2016; CHANDRASEKARAN Y NEAL-PERRY, 2017). La dieta materna durante el periodo previo a la implantación sirve como señal de regulación del futuro crecimiento del embrión, ya que el periodo de preimplantación resulta clave en dicho proceso (MACLAUGHLIN ET AL., 2005; PICONE ET AL., 2011; DAOUD ET AL., 2012). Además, el peso corporal de la hembra antes e inmediatamente tras la fecundación parece tener un papel determinante en el crecimiento feto-placental al inicio de la gestación (MACLAUGHLIN ET AL., 2005)

Por otra parte, la obesidad y el sobrepeso también aumentan el riesgo a sufrir un embarazo afectado por anomalías congénitas, como se ha visto en el caso de espina bífida, defectos en el tubo neural o anomalías cardiovasculares (CATALANO Y SHANKAR, 2017). Diversos estudios en este campo demuestran que los descendientes de madres obesas, con sobrepeso y/o con diabetes gestacional presentan un mayor riesgo de padecer obesidad, sobrepeso y/o diabetes a lo largo de su vida (SODERLUND, 2016). Según COWLEY (1991), los embriones en pleno desarrollo están bajo la influencia de los efectos hereditarios de la madre, como es la herencia citoplásmica, la edad materna y el peso corporal.

La placenta desempeña un papel muy importante en el desarrollo embrionario, y también se ve afectada por la obesidad y el sobrepeso. Las altas concentraciones de insulina presentes en hembras obesas afectan negativamente tanto a su desarrollo como a la expresión de genes responsables de la disfunción mitocondrial y la disminución del metabolismo energético (CATALANO Y SHANKAR, 2017). Dado que la placenta es imprescindible para establecer la conexión materno-embionaria, cualquier alteración en ella puede desencadenar problemas en el desarrollo del embrión. Es por ello por lo que existen informes que revelan tasas reducidas de nacimientos vivos y un mayor número de abortos involuntarios en mujeres obesas (MAHESHWARI ET AL., 2007; RITTENBERG, 2011).

Por último, en cuanto al parto, varios trabajos han relacionado la obesidad y el sobrepeso con problemas en la contractilidad miometrial, haciendo necesaria una cesárea. De este modo, cuanto mayor son la obesidad y el sobrepeso, se ha visto que aumenta la probabilidad de requerir una cesárea anticipada, lo cual lleva asociado también una serie de efectos, como es un mayor riesgo de corioamnionitis y de infecciones posparto (FERNÁNDEZ, 2016; SODERLUND, 2016; MANRIQUE, 2017).

1.4. Efectos de los tratamientos de superovulación

Las técnicas de recuperación de ovocitos y embriones suponen un elevado coste económico, a lo que se suma la reducida eficiencia de las técnicas a las que posteriormente pueden destinarse. Es por ello por lo que en muchos casos conviene someter a las hembras a un tratamiento de superovulación, con la finalidad de optimizar tanto el número de ovocitos y/o embriones obtenidos como el uso de las técnicas reproductivas y genéticas para las que son necesarios (CORTELL ET AL., 2014).

Dicho procedimiento consiste en la inducción de la ovulación mediante la administración de una gonadotropina exógena, como puede ser la hormona eCG (gonadotropina coriónica equina) o FSH (hormona folículo estimulante) (CORTELL ET AL., 2014). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que dicha estimulación puede resultar en una menor calidad de los ovocitos y embriones, debido a fallos en la maduración y/o liberación de los óvulos, un aumento de la tasa de gametos sin fecundar o el número de folículos hemorrágicos (FUJIMOTO ET AL., 1974; CHRENEK ET AL., 1998; KAUFFMAN ET AL., 1998; LEONI ET AL., 2001; MEHAISEN ET AL., 2005; SALVETTI ET AL., 2007). Además, también puede conllevar un menor desarrollo de los embriones, una mayor tasa de mortalidad post-implantacional, un retraso en el crecimiento fetal e incluso un aumento de anomalías cromosómicas (SENGOKU Y DUKELOW, 1988; ERTZEID Y STORENG, 2001; VAN DER AUWERA Y D'HOOGHE, 2001)

Entre las consecuencias del tratamiento de superovulación en la calidad de los ovocitos y embriones recuperados, se ha visto que la administración de gonadotropinas puede alterar la concentración de esteroides circulantes, así como del β -estradiol y progesterona, hormonas cuyos niveles son críticos en los procesos de inseminación y concepción, responsables de crear el ambiente y sincronización embrión-endometrio adecuados en el momento de la implantación y durante el periodo de gestación (DONOGHUE, 1992; GREVE Y CALLESEN, 2001; LEE Y DEMAYO, 2004).

Tal y como se ha descrito, los efectos observados tras la aplicación del tratamiento pueden ser muy variables. No solo va a depender del protocolo de administración, concentración y tipo de hormona utilizada, sino que la respuesta ovulatoria depende de otros factores como es el momento del ciclo sexual en el que se encuentra la hembra, la edad, la nutrición, el ambiente, o incluso la genética, línea o raza de esta (STROUD Y HASLER, 2006; SQUIRES Y MCCUE, 2007).

1.5. Potencial de fertilidad en el esperma del macho

Diversos estudios han demostrado de forma consistente que existen diferencias en el potencial de fertilidad entre los machos, de forma que es posible establecer cierta dominancia biológica basada en un transporte, supervivencia y tiempo de capacitación del esperma, diferentes dentro del tracto reproductivo de la hembra (DZIUK, 1996).

En una inseminación heterospérmica, es decir, cuando se realiza una mezcla de esperma de diferentes machos y se utiliza para inseminar a una o varias hembras, se observan diferentes ratios de paternidad en la descendencia, a pesar de tener una calidad aparentemente similar

(FOOTE, 2003; VICENTE ET AL., 2004). El número desproporcionado de descendencia suele reflejar un macho dominante respecto al resto, aparentemente el más joven (AMANN ET AL., 2018). No obstante, la capacidad de fertilidad no solo depende del macho, sino también de diversos factores maternos (NICOL Y MCLAREN, 1974). La motilidad, la velocidad y el patrón de movimiento, y la respuesta diferencial del esperma ante las señales femeninas son importantes para habilitar las barreras de paso en el oviducto. Uno de los principales factores que explica la diferencia de ratios es el transporte selectivo de espermatozoides en la mujer (SAACKE ET AL., 1998).

Por otra parte, la obesidad y sobrepeso provoca alteraciones en el ambiente uterino como consecuencia de alteraciones en los niveles de LH, la cual estimula la maduración de las células de la granulosa que, junto con las células teca, se encargan de generar el moco cervical para permitir el paso de los espermatozoides, pudiendo alterar su transporte y selección (BARRIOS-DE-TOMASI ET AL., 2013)

2. OBJETIVOS

- Estudiar el efecto del sobrepeso materno en la fertilidad y calidad embrionaria en blastocitos de 6 días.
- Estudiar el efecto del sobrepeso sobre la selección espermática.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental del estudio

La figura 2 muestra un esquema del diseño experimental de este trabajo.

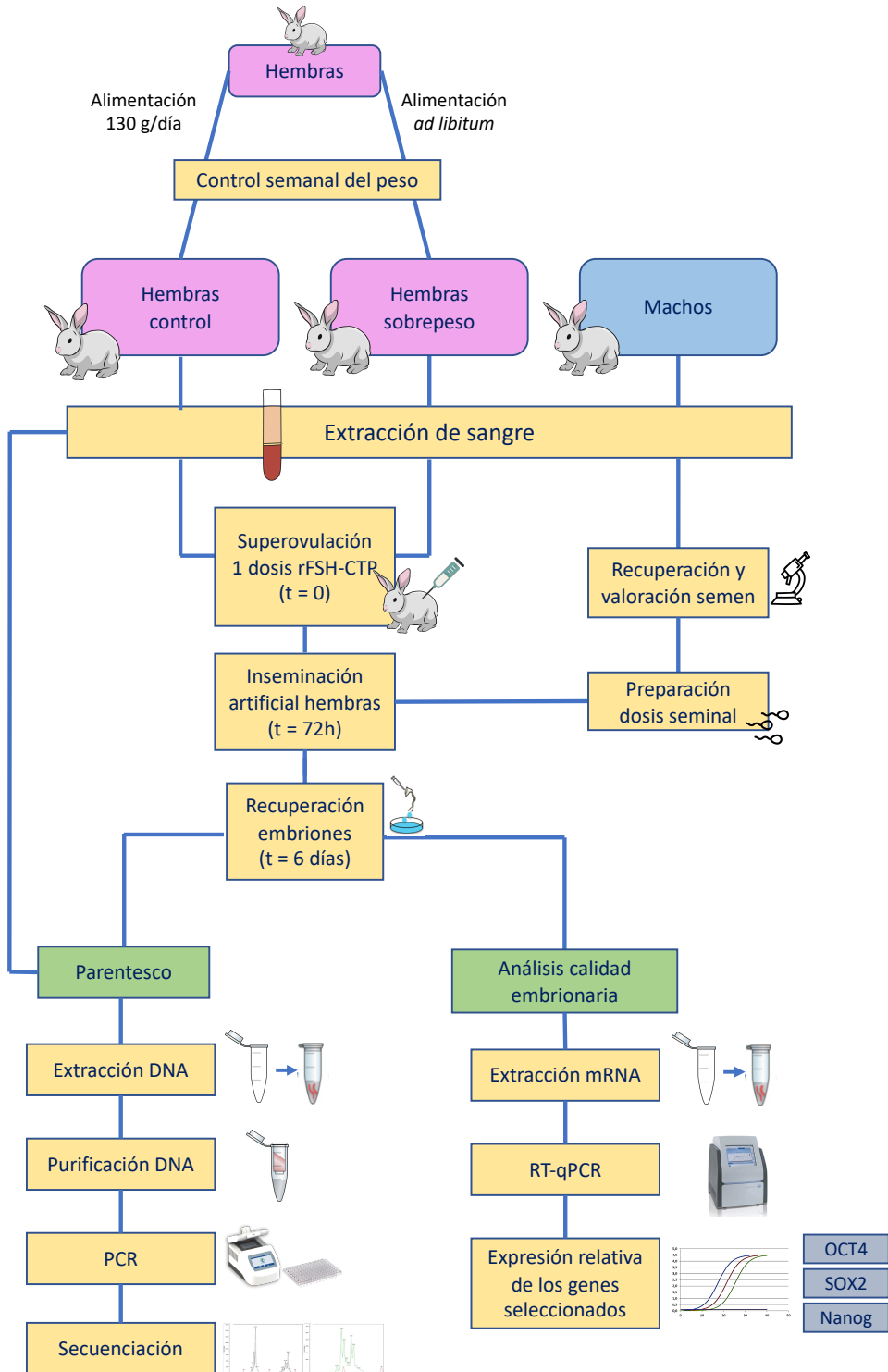


Figura 2. Diseño experimental del estudio. Asignación de paternidad y análisis de expresión génica.

3.2. Animales

Los animales utilizados en este estudio fueron proporcionados por la granja cunícola del Grupo de Mejora Genética Animal del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València. Se emplearon 15 hembras con edades comprendidas entre 4 y 5 meses y 4 machos de 5 meses de una línea RLP de *Oryctolagus cuniculus* de origen California (Figura 3). Dicha línea ha sido seleccionada por una combinación de tamaño de camada y ganancia media diaria durante el engorde.

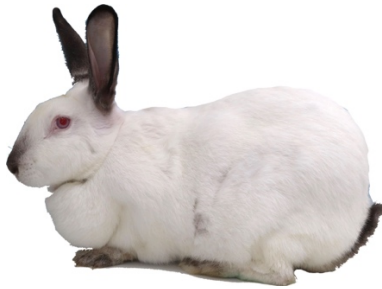


Figura 3. Línea de conejo de origen California empleada en el estudio.

Se han utilizado dos grupos de estudio (Figura 4): un grupo de hembras control, las cuales fueron alimentadas con una cantidad fija de 130 g de pienso al día durante el periodo de 15 semanas, es decir, desde los 4-5 meses hasta los 8-9 meses de edad; y un grupo de hembras alimentadas *ad libitum*, a las que se les permitió la ingesta libre de alimento (grupo sobrepeso). Se llevó a cabo un control semanal del peso corporal de todas las hembras y de la cantidad de pienso ingerido. Además, cada hembra sobrepeso era hermana de una control.

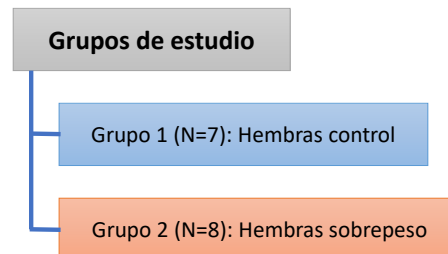


Figura 4. Esquema de los grupos de estudio empleados.

Los conejos fueron mantenidos en jaulas individuales en condiciones ambientales controladas, con un horario de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad al día, una temperatura media diaria de 17,5°C y máxima de 25,5°C. Fueron alimentados con pienso comercial y un acceso libre a agua filtrada. Los animales fueron manejados de acuerdo con los procedimientos aprobados por la Generalitat Valenciana para la instalación cunícola nº de registro 250V091. También han sido aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universitat Politècnica de València (código 2018/VSC/PEA/0116), de acuerdo 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).

3.3. Obtención de embriones

3.3.1. Tratamiento de superovulación

Todas las hembras, tanto las control como las sobrepeso, fueron superovuladas con una dosis de 0,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del animal de hormona corifolitropina alfa recombinante comercial (rFSH-CTP; Elonva® 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Merck Sharp & Dohme S.A.; Spain) suplementada con hCG. Las conejas donantes recibieron una inyección subcutánea de la 3 μg ELONVA suplementada con 5 UI hCG a tiempo 0.

3.3.2. Inseminación artificial

Tras 72 horas del tratamiento de superovulación, se procedió a la inseminación heterospérmica de todas las hembras de estudio. Para ello, en primer lugar, se extrajo un eyaculado de los cuatro machos que conformaban el experimento mediante el uso de una vagina artificial, según el método descrito por VICENTE ET AL. (2011). Una vez recogido el semen de cada uno de los machos, los tubos donde había sido recogido se trasladaron inmediatamente al laboratorio y se procedió a su valoración. Se utilizó una alícuota de cada eyaculado para realizar un análisis de las características macroscópicas y microscópicas del semen según los criterios descritos por MARCO-JIMÉNEZ ET AL. (2010). Para llevar a cabo el espermiograma se realizó un análisis macroscópico (color y volumen) y microscópico (motilidad, concentración y morfoanomalías) para, por una parte, determinar la calidad de los eyaculados y, por otra, ajustar la concentración de espermatozoides de cada macho a 4 millones, consiguiendo por tanto una dosis total de 16 millones. Para la valoración microscópica se obtuvo una muestra diluida 1:20 en Tris-Cítrico-Glucosa determinando la motilidad y viabilidad, y otra muestra diluida 1:20 en glutaraldehído al 0.25%, para determinar la concentración y morfoanomalías.

Motilidad

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

- Velocidad curvilínea (VCL) ($\mu\text{m}/\text{s}$): 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) ($\mu\text{m}/\text{s}$): 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) ($\mu\text{m}/\text{s}$): 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 (STR) (%): 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. $(VSL/VCL) \times 100$.
- 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. $(VAP/VCL) \times 100$.
- 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

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



Figura 5. Cámara cuentaglobos para determinar la concentración espermática.

Morfología

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) de un mínimo de 100 espermatozoides en cada una de las muestras.

Tras la preparación de la dosis heteroespérmica con una concentración de 16 millones (4 millones/macho), la inseminación vaginal se realizó mediante el uso de una cánula (Figura 6). Tras depositar la dosis en el fondo de la vagina, la inducción de la ovulación se realizó mediante una inyección intramuscular de 1 µg de acetato de buserelina (Suprefact; Hoechst Marion Roussel, Höchst, Alemania), un análogo sintético de la GnRH.



Figura 6. Inseminación artificial con cánula.

3.3.3. Recuperación de embriones

Para la obtención de los embriones, se sacrificaron las hembras 6 días post-inseminación mediante la administración intravenosa de 1 mL/kg de petobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Vétoquinol, Madrid, Spain), y se obtuvieron de ellas los tractos reproductores *post-mortem*. Los embriones se recuperaron mediante la perfusión de cada cuerno uterino con 10 mL de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado con 0,2% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, M.O, USA) y antibióticos (penicilina G sódica 3000.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI y sulfato de dihidrostreptomina 1250 mg/L, Penivet, Divasa Farmavic, Barcelona, España), atemperado a 37°C.

El medio de la perfusión junto con los embriones se recogió en placas Petri de 60 mm. Posteriormente, se utilizó una lupa binocular para llevar a cabo el recuento de embriones (*Figura 7*) y obtener la tasa de recuperación (TR). Además del recuento de embriones, se valoró la tasa de ovulación (TO), contando el número de folículos con cicatriz por ovulación presentes en los ovarios (*Figura 8*), y la tasa de supervivencia embrionaria, calculada mediante la *Ecuación 1*.

$$\text{Tasa supervivencia (\%)} = \frac{TR}{TO} \times 100$$

Ecuación 1.

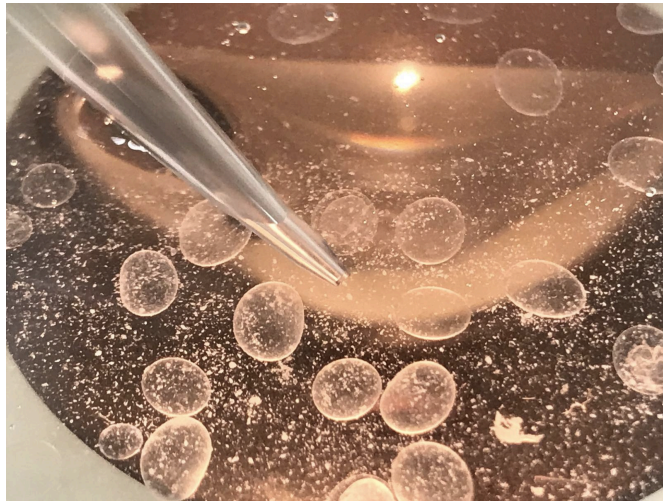


Figura 7. Embriones recuperados en estadio de blastocitos.

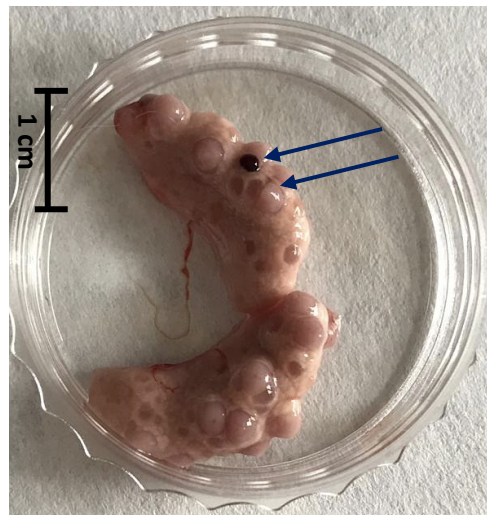


Figura 8. Ovarios con cuerpos lúteos.

Cada blastocisto recuperado fue almacenado de forma individual en strips de 8 microtubos de 200 μ l que contenían 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 mg/mL yeast tRNA (Ambion) siguiendo el protocolo descrito por SAKURAI ET AL. (2014), a diferencia de la disrupción celular, la cual se realizó mediante un proceso de homogeneización por congelación con nitrógeno líquido (2 repeticiones). Posteriormente, se añadió 400 μ g/mL de proteinasa y se incubó durante 1 h a 65°C, seguido de otra etapa de 10 min a 95°C. Paralelamente, un número medio de 7-10 embriones por hembra fueron destinados a un análisis de expresión génica, por lo que fueron recogidos en microtubos de 200 μ l con TRIzol y almacenados a -80°C hasta su utilización.

3.4. Análisis de paternidad

Para analizar el potencial de fecundación del espermatozoides tras la inseminación heterospermica se recurrió a asignar el parentesco de los embriones obtenidos de cada hembra. Esta asignación está basada en el análisis de genotipado con microsatélites polimórficos como marcadores de DNA.

3.4.1. Toma de muestra sanguínea y extracción de DNA de los parentales

Alcanzados los 3 meses de edad, se realizaron extracciones de sangre de todos los conejos que conforman el estudio para la posterior extracción de DNA. En este procedimiento, los animales fueron sometidos a una sedación mediante la administración intramuscular de una dosis de un cóctel compuesto por 0,5 ml de xilacina y 0,5 ml de ketamina. Posteriormente, se procedió a la toma de muestra sanguínea de aproximadamente 4 ml de sangre mediante la punción de la arteria central de la oreja (*Figura 9*), que fue recogida en tubos de EDTA como anticoagulante. Una vez finalizada la extracción, era conveniente tapar y agitar el tubo para que toda la sangre entrara en contacto con el EDTA y así evitar su coagulación.



Figura 9. Extracción de sangre de la arteria central de la oreja.

Una vez recogidas las muestras sanguíneas de todos los animales del estudio, se realizó la extracción de DNA y su posterior purificación. Para ello, se utilizó el kit comercial “*Molecular Biology Kit EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (Blood)*” de la empresa *BioBasic* (Markham, On, Canadá), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante, a excepción del paso de la proteinasa K, para el cual se modificó el volumen de 20 μ l por el de 50 μ l, y un tiempo de incubación a 50°C de 2 horas en lugar de 10 minutos, optimizándose así los resultados (QAMAR ET AL, 2017).

Para evaluar la extracción y purificación de DNA, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro *Nanodrop 2000* de la empresa *Thermo Fisher Scientific*® (Waltham, Ma, USA) (*Figura 10*). Estas muestras fueron preservadas en un congelador a -20°C hasta su utilización.



Figura 10. *Nanodrop 2000* de la empresa *Thermo Fisher Scientific*®.

Para este análisis de parentesco, se seleccionaron 3 hembras por cada grupo experimental (control y sobrepeso), de las cuales se recuperaron los embriones. El DNA de sus embriones se extrajo mediante el método descrito anteriormente (SAKURAI ET AL., 2014). Además, fue conveniente adicionar un paso de purificación mediante el empleo del kit comercial “*Molecular Biology Kit EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (Blood)*” de la empresa *BioBasic* (Markham, On, Canadá), aplicando el protocolo a partir del paso de la incubación con proteinasa K, con tal de obtener una muestra más limpia de DNA y optimizar los resultados de los posteriores procedimientos. Para establecer el parentesco se utilizaron 15 embriones por cada hembra, para ambos grupos.

3.4.2. PCR de los microsatélites

Para analizar el potencial de fecundación del espermatozoides tras la inseminación heterospermica se recurrió a asignar el parentesco de los embriones obtenidos de cada hembra. Esta asignación está basada en el análisis de genotipado con microsatélites polimórficos como marcadores de DNA. En primer lugar, se llevó a cabo la elección de los microsatélites aparentemente óptimos para poder establecer los parentescos, recogidos en la *Tabla 1* (CHANTRY-DARMON ET AL., 2005).

Tabla 1. Características de los cebadores de los microsatélites empleados en la PCR.

Microsatélite	Secuencias de primers	Tamaño amplificado	Nº de acceso	Referencia bibliográfica
INRACCDDV0036	PF: 5' CGCACAGACTCAACATCCAG	185 pb	AJ874398	CHANTRY-DARMON ET AL., 2005
	PR: 5' CCCTACAGGCAGAGGCTTAAT			
INRACCDDV0087	PF: 5' GATCTGGGACTCCAGAGTGTG	194 pb	AJ874430	CHANTRY-DARMON ET AL., 2005
	PR: 5' GAACACCGGTCTGGATGG			
INRACCDDV0157	PF: 5' AACACTTGCCCCCTTTTCAT	120 pb	AJ874497	CHANTRY-DARMON ET AL., 2005
	PR: 5' CAGGTTGTGGGAGTCTTGTC			
INRACCDDV0137	PF: 5' TACATTGAAAGGAAGCGAAGG	241 pb	AJ874477	CHANTRY-DARMON ET AL., 2005
	PR: 5' ATGGACGACATTTGTCCATA			
INRACCDDV0035	PF: 5' AACCACCAGGGTCAGCTTC	169 pb	AJ874397	CHANTRY-DARMON ET AL., 2005
	PR: 5' AGAGTGAGCGAGCGAGAGAC			

Una vez seleccionados los microsatélites, se realizó la amplificación de cada uno de ellos mediante la técnica de PCR, a partir de las muestras de DNA tanto de los parentales como de todos sus embriones. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, C.A) con un volumen final de 10 µl, utilizando un mix que contenía *Taq PCR Master Mix* (Qiagen), una concentración variable de los primers forward y reverse correspondientes dependiendo del microsatélite empleado, 3 µL de DNA y H₂O hasta completar el volumen final (*Tabla 2*) (GRIMAL ET AL., 2012).

Tabla 2. Composición de cada mix empleada en la PCR.

	Mix137	Mix183	Mix036	Mix087	Mix157
Master Mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
PF 5mM	0,4 µL	0,2 µL	0,3 µL	0,2 µL	0,2 µL
PR 5mM	0,4 µL	0,2 µL	0,3 µL	0,2 µL	0,2 µL
H ₂ O	1,2 µL	1,6 µL	1,4 µL	1,6 µL	1,6 µL
DNA (>100 ng/µL)	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
Volumen final	10 µL				

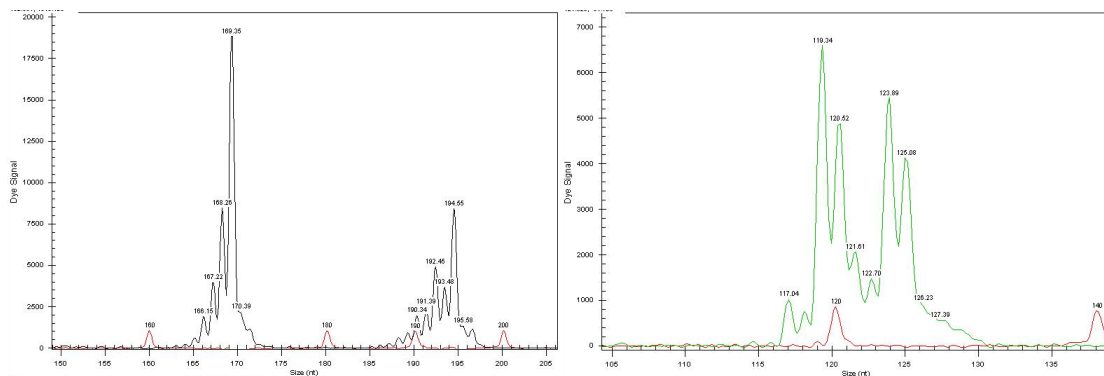
El programa de PCR fue ajustado a cada microsatélite dependiendo de las condiciones de temperatura requeridas, tal y como se indica en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Programas de tiempos y temperaturas de PCR para cada mix.

Mix	Programa PCR	
Mix 036	Activación Taq	94°C - 3 min
	Desnaturalización	95°C - 30 s
	Alineamiento	60°C - 30 s
	Extensión	72°C - 30 s
	Hibridación	72°C - 10 min
Mix 137	Activación Taq	94°C - 3 min
	Desnaturalización	95°C - 30 s
	Alineamiento	60°C - 1 min
	Extensión	72°C - 30 s
	Hibridación	72°C - 10 min
Mix 087	Activación Taq	94°C - 3 min
	Desnaturalización	95°C - 30 s
	Alineamiento	60°C - 1 min
	Extensión	72°C - 30 s
	Hibridación	72°C - 10 min
Mix 157	Activación Taq	94°C - 3 min
	Desnaturalización	95°C - 30 s
	Alineamiento	60°C - 1 min
	Extensión	72°C - 30 s
	Hibridación	72°C - 10 min

3.2.3. Secuenciación de los microsatélites

Las muestras amplificadas fueron secuenciadas en un *CEQ 8000 Beckman Coultek* por electroforesis capilar con marcaje fluorescente, con tal de detectar los picos (*Figuras 11 y 12*) de las secuencias amplificadas y determinar el genotipo de los parentales y embriones para cada uno de los microsatélites. Para preparar las muestras, se preparó un mix que contenía 0,2 µL de size y 30 µL de SLS por muestra.



Figuras 11 y 12. Ejemplos de picos en la secuenciación de los microsatélites.

3.4.4. Asignación del parentesco de los embriones

Para establecer el parentesco se utilizó el programa *Cervus 3.0* (*Field Genetics, London*), un método estadístico que permite asignar los padres a los hijos mediante marcadores genéticos. Se cargaron archivos que ofrecían al programa el genotipado de cada embrión, así como de las madres y los padres candidatos, es decir, los alelos para cada uno de los loci o microsatélites. Por otra parte, se cargó también un archivo que indicaba la madre y los cuatro posibles padres para cada embrión.

3.5. Análisis de expresión génica de los embriones

3.5.1. Extracción de RNA y retrotranscripción

Para la extracción de RNA, se utilizaron los pooles de embriones de las diferentes hembras y se aplicó el método de extracción de separación de fases con TRIzol/cloroformo del kit comercial RNasy® Plus Mini Kit de la empresa Qiagen (Venlo, Holanda) siguiendo el protocolo ofrecido por el fabricante. Con el objetivo de evitar la contaminación por DNA, se añadió un paso adicional de DNAsas (Roche, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, y las muestras fueron evaluadas en cuanto a concentración, calidad e integridad del RNA en un equipo espectrofotométrico Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific®*, Waltham, Ma, USA). Las muestras de RNA fueron almacenadas a -80°C.

Posteriormente, se llevó a cabo la transcripción reversa empleando el kit qScript™ Synthesis Kit (*Quanta Biosciences™*) siguiendo el protocolo del fabricante, con tal de obtener el cDNA. Además, para que todas las muestras tuvieran la misma concentración de cDNA (1µg) y así poder comparar entre ellas, fue necesario realizar una dilución con agua libre de DNAsas (*Sigma-Aldrich, Germany*) hasta un volumen de 15 µL. Seguidamente, se introdujo la dilución en el 2070 Thermal Cycler (*Applied Biosystems*) de acuerdo con las condiciones descritas en la *Tabla 4*. Finalmente, las muestras de cDNA fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización en el análisis de expresión génica.

Tabla 4. Programa de temperaturas y tiempos para la preparación del cDNA.

Etapa	Tª (°C)	t (min)
Extensión cebadores	22	5
Síntesis cDNA	42	30
Finalización reacción	85	5

3.5.2. Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (RT-qPCR)

La cuantificación relativa de los genes de interés se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR), haciendo uso del termociclador LightCycler® 96 System (*Roche, Suiza*). Los genes seleccionados para el análisis genético fueron los marcadores

de pluripotencialidad OCT4, SOX2 y NANOG, cuyas secuencias de los primers se recogen en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Características de los cebadores empleados en la RT-qPCR.

Gen	Secuencias de primers	Tamaño amplificado	Nº de acceso	Referencia bibliográfica
OCT4	PF: 5' CGAGTGAGAGGCAACTTGG	125 pb	NM:001099957	MAMO ET AL., 2008
	PR: 5' CGGTTACAGAACCACACACG			
SOX2	PF: 5' AGCATGATGCAGGAGCAG	270 pb	NM:003106	WANG ET AL., 2007
	PR: 5' GGAGTGGGAGGAAGAGGT			
NANOG	PF: 5' CCAGGTGCCTTTACAGACA	104 pb	ENSOCUT 00000013777	VIUDES-DE-CASTRO ET AL., 2015
	PR: 5' TCACTACTCTGGGACTGGGA			
H2AFZ	PF: 5' AGAGCCGGCTGCCAGTTCC	85 pb	AF030235	MAMO ET AL., 2008
	PR: 5' CAGTCGCGCCACACGTCC			

Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos con un volumen final de 10 µL por reacción. En cada pocillo se añadieron 5µL de solución FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Suiza), que contenía el marcador SYBR® Green como sistema de detección, la enzima FastStart Taq DNA Polymerase, MgCl₂, un buffer de reacción y un mix de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs). Además, se añadió 1 µl de cada primer, tanto forward como reverse. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones se muestran en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Programa de tiempos y temperaturas de la RT-qPCR.

Etapa	Nº Ciclos	Tª	t (s)
Preincubación	1	95°C	600
Amplificación	40	95°C	1
		60°C	30
Melting	1	95°C	10
		65°C	60
		97°C	1
Enfriamiento	1	37°C	30

Para medir los cambios de expresión de cada uno de los genes se compararon los niveles de expresión con los de un gen control que permanece invariable en todas las muestras, como puede ser un gen housekeeping (PFAFFL, 2004), en este caso la histona H2AFZ (MAMO ET AL., 2008), con la finalidad de normalizar las posibles variaciones de fluorescencia. Para dicha cuantificación se empleó la siguiente ecuación (*Ecuación 2*) (ROCHE, 2001).

$$Normalized\ Ratio = E_{f_{target}}^{(Ct\ calibrador - Ct\ muestra)} \cdot E_{f_{housekeeping}}^{(Ct\ muestra - Ct\ calibrador)}$$

Ecuación 2.

3.7. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software IBM SPSS Statistics versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), considerando significativas las diferencias con un $p\text{-value}<0.05$.

Para el análisis del peso semanal de los animales se ajustó un modelo lineal general (GLM), en el que se incluyó como efecto fijo el grupo experimental con dos niveles (control y sobrepeso). Además, se calcularon las diferencias de peso entre los dos grupos para cada semana y se representaron como la diferencia de sus medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de las medias (sobrepeso - control).

Para el estudio del efecto del peso sobre la expresión génica diferencial de los genes pluripotenciales OCT4, SOX2 y NANOG, en primer lugar, se realizó una prueba de normalidad de forma que todos los datos siguieran una distribución normal mediante una transformación angular, seguida de un análisis de varianza (ANOVA), utilizando un modelo lineal general que incluía como factor fijo el grupo experimental (control y sobrepeso).

Por último, para evaluar las tasas de ovulación, recuperación y peso de los ovarios, así como para el análisis de asignación de parentescos de los embriones, se hizo uso de un análisis cualitativo mediante la prueba de *chi-cuadrado* con la corrección de Yate's.

4. RESULTADOS

4.1. Seguimiento del peso de las hembras control y sobrepeso

Para determinar la existencia de dos grupos diferenciales de estudio tras alimentarlos de forma diferencial con una dieta controlada o *ad libitum*, durante un periodo de 15 semanas, se realizó un seguimiento semanal del peso de cada hembra de estudio. El peso medio de las hembras de cada grupo cada semana se muestra en la *Figura 13*, en el que es posible distinguir las líneas tanto del grupo control como el de sobrepeso. Además, se ha incluido una gráfica (*Figura 14*) que refleja la diferencia de pesos entre ambos grupos para cada uno de los controles semanales.

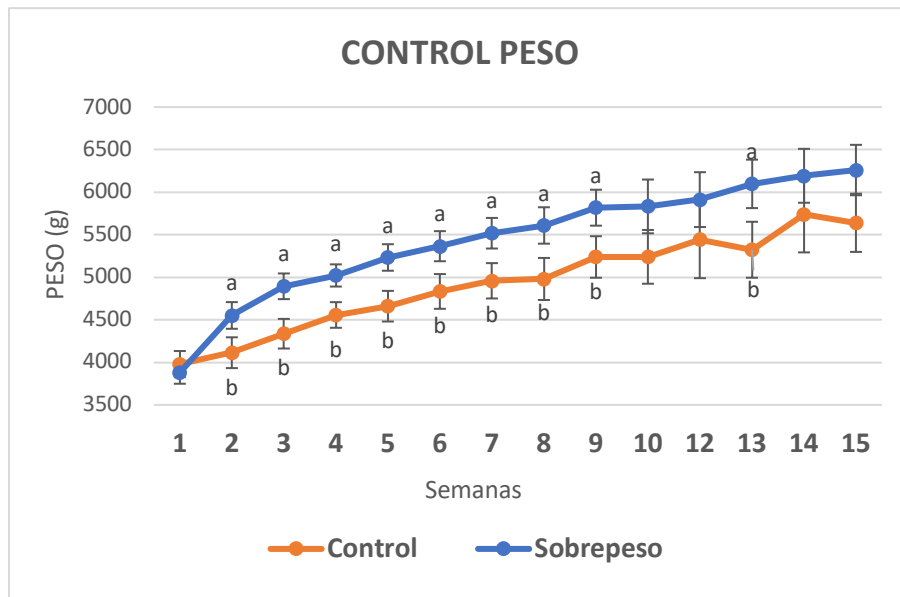


Figura 13. Seguimiento semanal del peso para hembras control y sobrepeso.

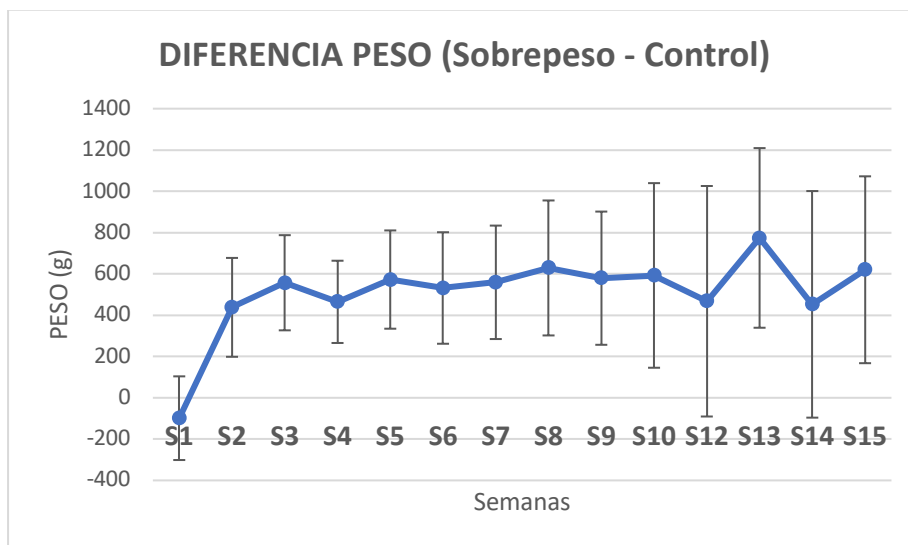


Figura 14. Diferencias en el peso semanal (Sobrepeso – Control).

En las gráficas se puede observar cómo en el momento inicial del estudio, apenas existe diferencia de peso entre ambos grupos, ya que se encontraban en condiciones similares (entorno a 3936 ± 350 g para las control y 3881 ± 384 g para las hembras sobrepeso). Sin embargo, a partir de la segunda semana se empiezan a observar diferencias significativas entre los pesos de ambos grupos, manteniéndose hasta la novena semana. Las semanas restantes, a excepción de la 13, dejan de ser significativas. Por otra parte, en la *Figura 12*, se observa que de la primera a la segunda semana hay un aumento claro de la diferencia de peso, que se mantiene hasta la semana 15 entre los valores de 400 y 600 g.

4.2. Análisis de parámetros seminales para la mezcla heteroespérmica

Para confirmar que no existen diferencias en la calidad espermática entre los eyaculados de los cuatro machos candidatos a la inseminación artificial, se analizaron los diferentes parámetros seminales mediante un ANOVA (*Tabla 7*).

Tabla 7. Análisis de los diferentes parámetros seminales para cada macho y su significación.

Parámetro	Machos				p-value
	A	B	C	D	
Motilidad (%)	88.9 ± 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 ($\mu\text{m/s}$)	82.4 ± 6.66	87.7 ± 6.66	97.6 ± 6.66	99.1 ± 6.66	0.301
VSL ($\mu\text{m/s}$)	51.5 ± 5.10	41.8 ± 5.10	42.9 ± 5.10	41.7 ± 5.10	0.505
VAP ($\mu\text{m/s}$)	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
STR (%)	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	2.9 ± 0.29	0.712
BCF (Hz)	8.7 ± 0.46	8.7 ± 0.46	9.1 ± 0.46	8.1 ± 0.46	0.520

Tal y como indican los valores de *p-value* (>0.05) para cada parámetro seminal, los eyaculados de los cuatro machos no difieren de forma significativa en ninguno de ellos.

4.3. Tasas de ovulación, recuperación de embriones y peso de ovarios

Tras la obtención *post-mortem* del tracto reproductor de cada coneja, se recogieron las tasas de ovulación, las tasas de recuperación de embriones y el porcentaje de embriones recuperados para las hembras control y sobrepeso, así como el peso medio de sus ovarios.

Los datos sobre la tasa de ovulación (*Figura 15*) no muestran diferencias estadísticamente significativas entre las hembras control y sobrepeso (60.8 ± 17.89 y 76.1 ± 15.51).

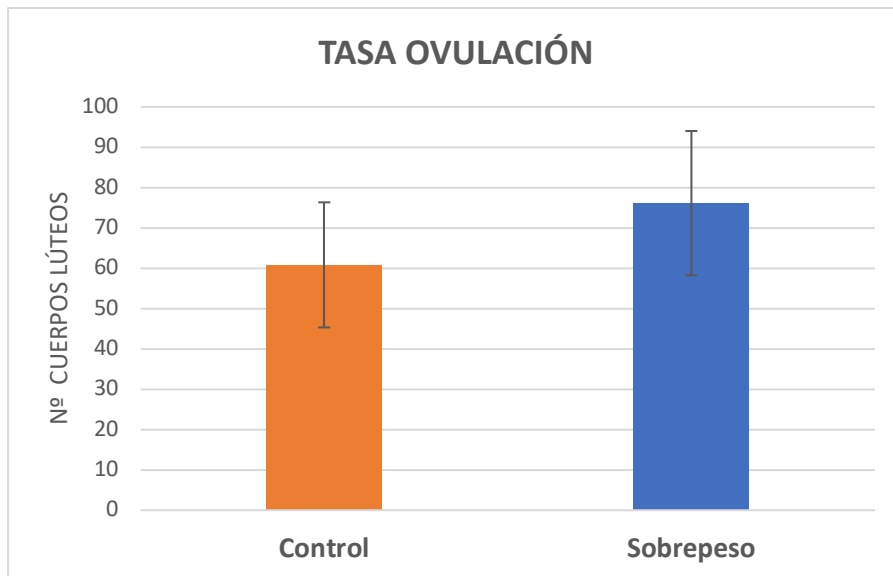


Figura 15. Tasa de ovulación media para hembras control y sobrepeso.

Los resultados de las tasas de recuperación entre hembras control y con sobrepeso tampoco presentaron diferencias entre ambos grupos (50.0 ± 10.02 y 39.3 ± 9.80 , respectivamente) (Figura 16). Sin embargo, la tasa de supervivencia de embriones (Figura 17) sí que mostró diferencias entre ambos grupos, siendo mayor en el caso de las hembras control, con un 82.20% y un 51.60% las hembras con sobrepeso ($p\text{-value} < 0.05$).

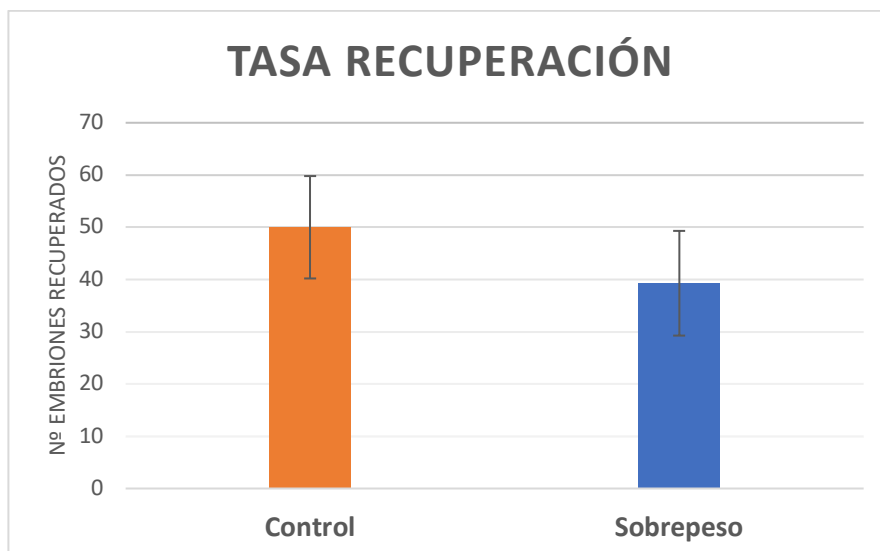


Figura 16. Tasa de recuperación media para hembras control y sobrepeso.

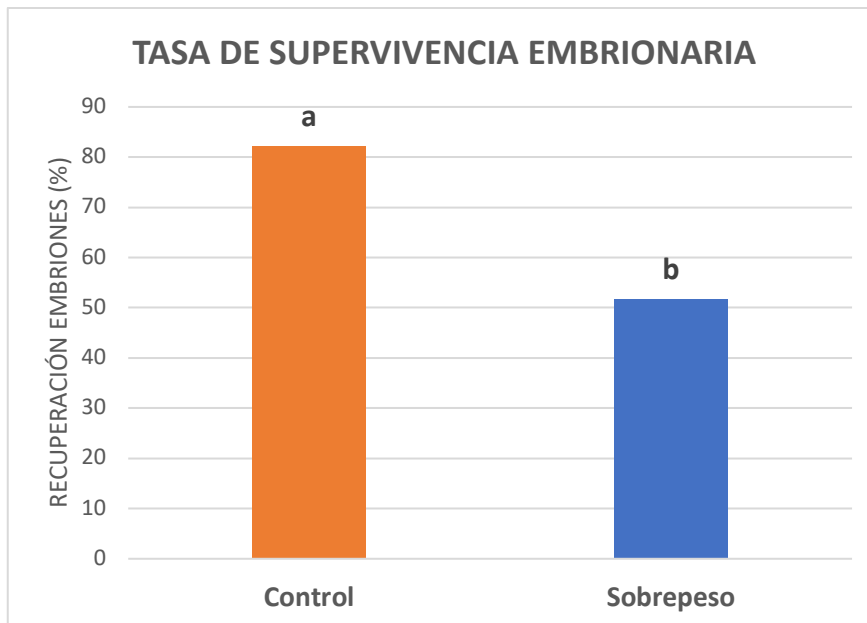


Figura 17. Tasa de supervivencia embrionaria o porcentaje de embriones recuperados para hembras control y sobrepeso.

Por último, el peso medio de los ovarios de cada grupo tampoco presentó diferencias significativas entre control y sobrepeso (1.1 ± 0.22 y 1.3 ± 0.26 , respectivamente), como se muestra en la siguiente gráfica (*Figura 18*).

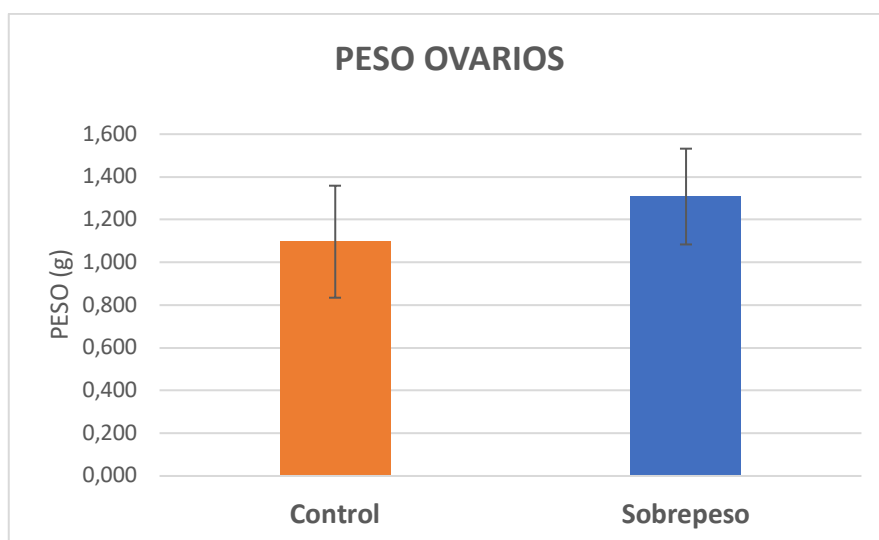


Figura 18. Peso de los ovarios en promedio para hembras control y sobrepeso.

4.4. Expresión génica de los embriones

Para analizar si existían diferencias en la calidad embrionaria entre los embriones de ambos grupos, se analizó la expresión de los genes seleccionados a partir de los datos de la RT-qPCR, que fueron procesados y recogidos en un gráfico de barras (*Figura 19*), en el que es posible observar la expresión de los tres genes para cada grupo experimental. Según los resultados,

ningún gen parece presentar una expresión diferencial significativa, confirmado por un análisis de la varianza (ANOVA) con un $p\text{-value}>0.05$.



Figura 19. Expresión génica de los genes SOX2, OCT4, NANOG para hembras control y sobrepeso.

4.5. Asignación de parentescos

La secuenciación de los microsatélites previamente amplificados mediante PCR permite establecer los diferentes alelos de cada uno de ellos (Tabla 8). De esta forma, es posible determinar el genotipo tanto de los embriones como de los parentales y, por tanto, asignar parentescos.

Tabla 8. Alelos establecidos para cada microsatélite tras su secuenciación.

	Microsatélites				
	0137	0036	0157	0087	0035
Alelos	240	176	119	196	170
	246	181	121	200	190
	249	183	123	205	194

Tras procesar todos los datos en el programa *Cervus*, éste consiguió asignar la paternidad de cada embrión basándose en sus genotipos y en el de los parentales, representado en un gráfico de barras (Figura 20). En él se refleja la cantidad de embriones de cada grupo que se han conseguido asignar para cada macho candidato a ser padre. Según el análisis estadístico, no existen diferencias significativas en el patrón de descendencia entre hembras control y sobrepeso.

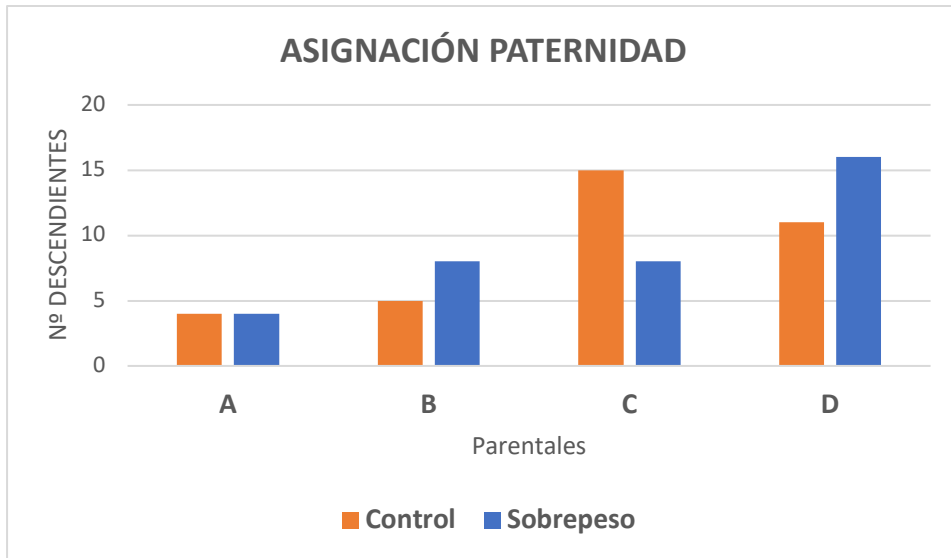


Figura 20. Parentales asignados a los embriones de ambos grupos de estudio por *Cervus*.

5. DISCUSIÓN

Los resultados recogidos confirman que en este estudio existen dos grupos experimentales claramente distintos, reflejado en una diferencia de peso generalmente significativa. Estas diferencias se justifican con la media de ingesta diaria para cada grupo, siendo de 130 g/día para las control y de 272 g/día para las hembras sobrepeso. El hecho de que a partir de la novena semana desaparezca esta significación es debido a que en ese momento del estudio ya había tenido lugar la primera tanda de extracción de embriones, por lo que el número de hembras sobre las que se realizaba el control era menor, modificando la consistencia del análisis. No obstante, mediante la gráfica de diferencia de peso entre hembras sobrepeso y control es posible deducir que, aunque estadísticamente no resulte significativo por la reducción del número de animales, sí lo es de forma descriptiva, pues durante estas últimas semanas se mantiene una diferencia similar de peso de 500-600 g, lo cual se considera significativo para un animal que ronda los 5kg de peso corporal.

En cuanto a los parámetros de fertilidad analizados en este estudio (tasa de ovulación, tasa de recuperación, tasa de supervivencia, calidad embrionaria y asignación de parentesco) para observar el efecto del sobrepeso sobre la misma, únicamente se han encontrado diferencias en el porcentaje de supervivencia embrionaria. CARDINALI ET AL. (2008), confirman que la condición corporal afecta a nivel de ovocitos, concretamente en la frecuencia ovulatoria. Según SODERLUND (2016) Y HOHOS Y SKAZNIK-WIKIEL (2017), afirmaban que el estado de obesidad y sobrepeso produce una disminución de la tasa de ovulación, debido a alteraciones en el ambiente donde tiene lugar la maduración de los óvulos. Otros tipos de trabajos cuyo objetivo era estudiar el efecto del régimen alimentario (KWONG ET AL., 2000; NATURIL ET AL., 2017), no lograron establecer diferencias significativas en la tasa de ovulación, aunque tampoco en el porcentaje de recuperación (KWONG ET AL., 2000; CARDINALI ET AL., 2008), a diferencia de este estudio. En este caso, cabe destacar que, en este experimento, ambos grupos fueron sometidos a un tratamiento de superovulación, lo que podría reducir las diferencias entre ellos.

El hecho de no encontrar diferencias significativas en el análisis de parentales sugiere que no parece haber efecto de selección espermática por parte del ambiente uterino entre ambos grupos, puesto que no se detectó un patrón de descendencia diferencial entre ellos, sino dependiente del macho. Además, la ausencia de diferencias en los parámetros de calidad espermática analizados de los diferentes machos no resulta significativamente diferente, por lo queda descartado cualquier posible efecto de la misma. Además, se realizó un análisis de expresión génica de los embriones recuperados con los genes OCT4, SOX2 y NANOG, empleados generalmente como marcadores clave para evaluar la calidad embrionaria (SAENZ-DE-JUANO ET AL., 2016; SINGH ET AL., 2019). Estos genes son responsables de la autorrenovación y mantenimiento de la pluripotencialidad de las células embrionarias (DARR Y BENVENISTY, 2006; BISWAS Y HUTCHINS, 2007), siendo OCT4 y NANOG factores importantes en la regulación del sistema de la pluripotencia, ya que actúan como activador o represor de muchos otros genes diana involucrados en la diferenciación celular y el desarrollo embrionario temprano (FOYGEL ET AL., 2008; MEDVEDEV ET AL., 2008). En el caso de SOX2, no solo mantiene la pluripotencia de las células, sino que también actúa en la reprogramación de células somáticas ya diferenciadas a un

estado embrionario pluripotente y también en la diferenciación neural, así como en los mecanismos moleculares derivados de estas funciones (ZHANG Y CUI, 2014).

Se conoce que la nutrición materna y la condición corporal antes de tener lugar el apareamiento e inmediatamente después, afectan sobre el desarrollo embrionario y el desarrollo fetal (MACLAUGHLIN ET AL., 2005; WATKINS ET AL., 2008; PICONE ET AL., 2011). En este estudio no encontraron diferencias significativas en la expresión génica de los genes seleccionados entre los embriones de las hembras de ambos grupos, de forma que no es posible afirmar que para hembras con sobrepeso la calidad embrionaria sea inferior. Se ha sugerido que, en el caso de obesidad y sobrepeso, éstos afectan al desarrollo temprano del embrión, pero los datos de los cuales se dispone son muy poco consistentes. Existen estudios cuyos resultados apoyan el efecto de la obesidad y sobrepeso sobre la calidad embrionaria (MA ET AL., 2016), y estudios que informan de lo contrario (IGOSHEVA ET AL., 2010; BERMEJO-ALVAREZ ET AL., 2012). Según BELLVER ET AL. (2010), las reducidas tasas de embarazo en mujeres con sobrepeso no son debidas a una menor calidad del embrión, sino de las alteraciones que se producen en el ambiente uterino. De esta forma, aunque en este estudio a nivel embrionario y para el grupo de genes seleccionados no se encuentren diferencias, el ambiente uterino de la hembra podría haberse visto modificado y que aparecieran diferencias tras la implantación embrionaria, cuando el embrión y el endometrio entran en contacto, y durante el desarrollo gestacional.

Aunque el endometrio desempeña un papel importante para la supervivencia del embrión, es probable que el factor más influyente en la fertilidad sea la baja calidad de los ovocitos (BREWER, 2010). El hecho de que se encontraran diferencias en la tasa de supervivencia embrionaria podría estar indicando que en las hembras control el número de ovocitos viables es mayor. En esta línea, son varios los trabajos que revelan que alteraciones en el régimen nutricional previo al apareamiento tiene efectos a nivel folicular y ovocitario (NATURIL-ALFONSO ET AL., 2017; IMTERAT ET AL., 2019). Según JUNGHEIM ET AL. (2010), una dieta alta en grasas da lugar a un mayor porcentaje de apoptosis folicular, un menor número y tamaño de ovocitos ovulados y retraso en su maduración (JUNGHEIM ET AL., 2010), así como una baja calidad de ovocitos (MINGE ET AL., 2008). De esta forma, las hembras sobrepeso podrían presentar una menor calidad ovocitaria que podría verse reflejada en un menor porcentaje de supervivencia de embriones. Sin embargo, se ha visto que el tratamiento de superovulación puede resultar en una menor calidad de los ovocitos, consecuencia de fallos a nivel de maduración y/o liberación de óvulos, un aumento de la tasa de gametos sin fecundar o el número de folículos hemorrágicos (FUJIMOTO ET AL., 1974; CHRENEK ET AL., 1998; KAUFFMAN ET AL., 1998; LEONI ET AL., 2001; MEHAISEN ET AL., 2005; SALVETTI ET AL., 2007). No obstante, en este estudio ambos grupos han sido superovulados, por lo que podría ser que existieran diferencias en la respuesta al tratamiento, ya que esta depende, entre otros factores, de la nutrición (STROUD Y HASLER, 2006; SQUIRES Y MCCUE, 2007).

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados discutidos en este estudio, es posible deducir las siguientes conclusiones:

- El estado de sobrepeso en la hembra no parece afectar a la tasa de ovulación y de recuperación, aunque sí a la tasa de supervivencia de embriones, siendo mayor el porcentaje de embriones recuperados en hembras control. Este hecho puede ser debido a una menor calidad ovocitaria en hembras con sobrepeso o como consecuencia de posibles cambios en el ambiente uterino debido al estado de sobrepeso en la hembra. Sin embargo, la calidad embrionaria no parece verse afectada por la condición corporal materna, ya que no se observan diferencias en la expresión génica de OCT4, SOX2 y NANOG.
- El estado de sobrepeso no parece mostrar diferencias en el patrón de descendencia para los machos empleados, ya que no se observa un patrón distinto para los grupos de estudio, sino que difiere en función del macho.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AKINGBEMI, B.T. (2005). Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol*, 3: p. 51.
- AMANN, R.P.; SAACKE, R.G.; BARBATO, G.F. Y WABERSKI, D. (2018). Measuring Male-to-Male Differences in Fertility or Effects of Semen Treatments. *Annual Review of Animal Biosciences*, 6(1), 255–286.
- ARTEAGA L, A. (2012). Overweight and obesity as an universal health problem. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), 145-153.
- BAKKER, J. Y BAUM, M.J. (2000). Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(3), 220–262.
- BARRIOS-DE-TOMASI, J.; BARRIOS-DE-TOMASI, E. Y VERGARA-GALICIA, J. (2013). Obesity effects on female reproduction. *Rev Mex Cienc Farm*, 44(3), 8-18.
- BELLOC, S.; COHEN-BACRIE, M.; AMAR, E.; IZARD, V.; BENKHALIFA, M.; DALLEAC, A. Y DE MOUZON, J. (2014). High body mass index has a deleterious effect on semen parameters except morphology: Results from a large cohort study. *Fertility and Sterility*, 102, 1268– 1273.
- BELLVER, J.; AYLLÓN, Y.; FERRANDO, M.; MELO, M.; GOYRI, E.; PELLICER, A.; REMOHÍ, J. Y MESEGUER, M. (2010). Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertility And Sterility*, 93(2), 447-454.
- BERMEJO-ALVAREZ, P.; ROSENFELD, C.S. Y ROBERTS, R.M. (2012). Effect of maternal obesity on estrous cyclicity, embryo development and blastocyst gene expression in a mouse model. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(12), 3513–3522.
- BISWAS, A. Y HUTCHINS, R. (2007). Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 16(2), 213–222.
- BREWER, C. Y BALEN, A. (2010). The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction*, 140(3), 347-364.
- CAÑÓN J. (2015). Historia, caracterización y situación actual del Conejo Antiguo Pardo Español. *ASEMUCE*.
- CARDINALI, R.; DAL BOSCO, A.; BONANNO, A.; DI GRIGOLI, A.; REBOLLAR, P.G.; LORENZO, P.L. Y CASTELLINI, C. (2008). Connection between body condition score, chemical characteristics of body and reproductive traits of rabbit does. *Livest Sci* 116, 209– 215.
- CATALANO, P. M. Y SHANKAR, K. (2017). Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long-term adverse consequences for mother and child. *BMJ*, j1.
- CHANDRASEKARAN, S. Y NEAL-PERRY, G. (2017). Long-term consequences of obesity on female fertility and the health of the offspring. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 29(3), 180–187.

- CHANTRY-DARMON, C.; URIEN, C.; HAYES, H.; BERTAUD, M.; CHADI-TAOURIT, S.; CHARDON, P.; VAIMAN, D. Y ROGEL-GAILLARD, C. (2005). Construction of a cytogenetically anchored microsatellite map in rabbit. *Mammalian Genome*, 16(6), 442-459.
- CHRENEK, P.; MAKAREVICH, A.; VASICEK, D.; LAURINCIC, J.; BULLA, J.; GAJARSKA, T. Y RAFAY, J. (1998). Effects of superovulation, culture and microinjection on development of rabbit embryos in vitro. *Theriogenology*, 50(4): 659-666.
- CORDIER, A.; LÉVEILLÉ, P.; DUPONT, C.; TARRADE, A.; PICONE, O.; LARCHER, T.; DAHIREL, M.; POUMEROL, E.; MANDON-PEPIN, B.; LÉVY, R. Y CHAVATTE-PALMER, P. (2013). Dietary Lipid and Cholesterol Induce Ovarian Dysfunction and Abnormal LH Response to Stimulation in Rabbits. *Plos ONE*, 8(5), e63101.
- CORTELL, C.; SALVETTI, P.; JOLY, T. Y VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2014). Effect of different superovulation stimulation protocols on adenosine triphosphate concentration in rabbit oocytes. *Zygote*, 23(04), 507–513.
- COWLEY, D.E. (1991). Prenatal effects on mammalian growth: embryo transfer results. *Proc 4th Int Cong Syst Evol Biol* 2, 762– 779.
- DAĞ, Z.Ö. Y DILBAZ, B. (2015). Impact of obesity on infertility in women. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 16(2), 111–117.
- DARR, H. Y BENVENISTY, N. (2006). Human embryonic stem cells: the battle between self-renewal and differentiation. *Regenerative Medicine*, 1(3), 317–325.
- DAOUD, N.M.; MAHROUS, K.F. Y EZZO, O. H. (2012). *Feed restriction as a biostimulant of the production of oocyte, their quality and GDF-9 gene expression in rabbit oocytes*. *Animal Reproduction Science*, 136(1-2), 121–127.
- DE MADDALENA, C.; VODO, S.; PETRONI, A. Y ALOISI, A. M. (2012). Impact of testosterone on body fat composition. *Journal of Cellular Physiology*, 227(12), 3744–3748.
- DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; MUNSON, L.; BROWN, J.L. Y WILDT, D.E. (1992). Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol Reprod*, 46, 972-980.
- DZIUŁ, P. (1996). Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. *Animal Reproduction Science*, 43(2-3), 65-88.
- ERTZEID, G. Y STORENG, R. (2001). The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod*, 16, 221-225.
- ESINLER, I.; BOZDAG, G. Y YARALI, H. (2008). Impact of isolated obesity on ICSI outcome. *Reproductive Biomedicine Online*, 17583–587.
- FERNÁNDEZ, J.J.; PAUBLETE, M.C.; GONZÁLEZ, M.C.; CARRAL, F.; CARNICER, C.; VILAR, A.; TORREJÓN, R. Y MORENO, L.J. (2016). Sobrepeso y obesidad maternos como factores de riesgo independientes para que el parto finalice en cesárea. *Nutrición Hospitalaria*, 33(6), 1324-1329.
- FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VILEBAHN, C.; NAVARRETE-SANTOS, A. Y DURANTHON, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1), 1-10.

FISCHER, B.; SCHINDLER, M.; MAREIKE PENDZIALEK, S.; GÜRKE, J.; HAUCKE, E.; GRYBEL, K.J.; THIEME, R. Y SANTOS, A.N. (2017). The Long-Term Effect of the Periconception Period on the Embryo's Epigenetic Profile and Phenotype: The Role of Maternal Disease Such as Diabetes and How the Effect Is Mediated (Example from a Rabbit Model). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 107–115.

FOOTE, R.H. (2003). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci*, 75, 119-39.

FOYGEL, K.; CHOI, B.; JUN, S.; LEONG, D.; LEE, A.; WONG, C.; ZUO, E.; ECKART, M.; REIJO, R.A.; WONG, W.H. Y YAO, M.W.M. (2008). A Novel and Critical Role for Oct4 as a Regulator of the Maternal-Embryonic Transition. *Plos ONE*, 3(12), e4109.

FUJIMOTO, S.; PAHLAVAN, N. Y DUKELOW, W.R. (1974). Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J Reprod Fertil*, 40(1): 177-181.

GOSMAN, G.G.; KATCHER, H.I. Y LEGRO, R.S. (2006). Obesity and the role of gut and adipose hormones in female reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 12(5), 585–601.

GREVE, T. Y CALLESEN, H. (2001). Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod Nutr Dev*, 41, 451-459.

GRIMAL, A.; SAFAA, H.M.; SAENZ-DE-JUANO, M.D.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; MEHAISEN, G.M.K.; ELSAYED, D.A.A.; LAVARA, R.; MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VICENTE, J.S. (2012). Phylogenetic relationship among four egyptian and one spanish rabbit populations based on microsatellite markers. *Proceeding 10th World Rabbit Congress*, 117-181.

HOFFMAN, L.H.; OLSON, G.E.; CARSON, D.D. Y CHILTON, B.S. (1998). Progesterone and Implanting Blastocysts Regulate Muc1 Expression in Rabbit Uterine Epithelium. *Endocrinology*, 139(1), 266-271.

HOHOS, N. Y SKAZNIK-WIKIEL, M. (2017). High-Fat Diet and Female Fertility. *Endocrinology*, 158(8), 2407-2419.

IGOSHEVA, N.; ABRAMOV, A.; POSTON, L.; ECKERT, J.; FLEMING, T. Y DUCHEN, M. (2010). Maternal Diet-Induced Obesity Alters Mitochondrial Activity and Redox Status in Mouse Oocytes and Zygotes. *Plos ONE*, 5(4), e10074.

IMTERAT, M.; AGARWAL, A.; ESTEVES, S. C.; MEYER, J. Y HARLEV, A. (2019). *Impact of Body Mass Index on female fertility and ART outcomes. Panminerva Medica*, 61(1).

JUNGHEIM, E.S.; SCHOELLER, E.L.; MARQUARD, K.L.; LOUDEN, E.D.; SCHAFFER, J.E. Y MOLEY, K.H. (2010). Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. *Endocrinology*, 151(8), 4039–4046.

KAUFFMAN, R.D.; SCHMIDT, P.M.; RALL, W.F. Y HOEG, J.M. (1998). Superovulation of rabbits with FSH alters in vivo development of vitrified morulae. *Theriogenology*, 50(7): 1081-1092.

KIM, S.T.; MARQUARD, K.; STEPHENS, S.; LOUDEN, E.; ALLSWORTH, J. Y MOLEY, K.H. (2011). Adiponectin and adiponectin receptors in the mouse preimplantation embryo and uterus. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(1), 82–95.

KORT, H. (2006). Impact of Body Mass Index Values on Sperm Quantity and Quality. *Journal Of Andrology*, 27(3), 450-452.

KWONG, W.Y.; WILD, A.E.; ROBERTS, P.; WILLIS, A.C. Y FLEMING, T.P. (2000). Maternal undernutrition during preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 127, 4195– 4202.

LAURENTINO, S.; BORGMANN, J. Y GROMOLL, J. (2016). On the origin of sperm epigenetic heterogeneity. *Reproduction*, 151(5), R71-R78.

LEE, K.Y. Y DEMAYO, F.J. (2004). Animal models of implantation. *Reproduction*, 128(6), pp.679–695.

LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.; LEDDA, S. Y NAITANA, S. (2001). Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod Nutr Dev*, 41(3): 239-246.

LEVENS, E.D. Y SKARULIS, M.C. (2008). Assessing the role of endometrial alteration among obese patients undergoing assisted reproduction. *Fertility and Sterility*, 89, 1606–1608.

LI, F.; YANG, Q.; SHI, H.; XIN, H.; LUO, X. Y SUN, Y. (2019). Effects of obesity on sperm retrieval, early embryo quality and clinical outcomes in men with nonobstructive azoospermia undergoing testicular sperm aspiration-intracytoplasmic sperm injection cycles. *Andrologia*, e13265.

LOH, Y.H.; WU, Q.; CHEW, J.L.; VEGA, V.B.; ZHANG, W.; CHEN, X.; BOURQUE, G.; GEORGE, J.; LEONG, B.; LIU, J.; WONG, K.Y.; SUNG, K.W.; LEE, C.W.; ZHAO, X.D.; CHIU, K.P.; LIPOVICH, L.; KUZNETSOV, V.A.; ROBSON, P.; STANTON, L.W.; WEI, C.L.; RUAN, Y.; LIM, B. Y NG, H.H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genet* 38, 431-440.

MACDONALD, A.; HERBISON, P.; SHOWELL, M. Y FARQUHAR, M. (2010). The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: A systematic review with meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 16, 293– 311.

MACLAUGHLIN, S.M.; WALKER, S.K.; ROBERTS, C.T.; KLEEMANN, D. Y McMILLEN, I.C. (2005). Periconceptional nutrition and the relationship between maternal body weight changes in the periconceptional period and feto-placental growth in the sheep. *J Physiol* 565, 111– 124.

MAHESHWARI, A.; STOFBERG, L. Y BHATTACHARYA, S. (2007). Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology—a systematic review. *Hum Reprod Update*; 13:433–444.

MAHMOUD, K.G.H.; MOBARAK, M.S.; FARGHALY, A.A.; SHAHEIN, Y.E. Y EZZO, O.H. (2006). Effect of dietary restriction on genetic material and reproductive performance in rabbit. *Egypt J Genet Cytol*, 35, 129-143.

MALO-SERRANO, M.; CASTILLO, N. Y PAJITA, D. (2017). La obesidad en el mundo. *Anales de la Facultad de Medicina*, 78(2), 173-178.

MAMO, S.; GAL, A.B.; POLGAR, Z. Y DINNYES, A. (2008). Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5f1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology*, 9: 67.

MANRIQUE, H. (2017). Impacto de la obesidad en la salud reproductiva de la mujer adulta. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 63(4), 607-614.

MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VICENTE, J.S. (2017). Overweight in young males reduce fertility in rabbit model. *PLoS one*, 12(7), e0180679.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; BALASCH, S. Y VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2010). Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Repro Domest Anim*, 45(5), 118-123.

MEHAISEN, G.M.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R. Y VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2005). Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci*, 90(1-2): 175- 184

MEDVEDEV, S.P.; SHEVCHENKO, A.I.; MAZUROK, N.A. Y ZAKIAN, 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), 1377–1393.

MINGE, C.E.; BENNETT, B.D.; NORMAN, R.J. Y ROBKER, R.L. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. *Endocrinology* 149:2646–2656

MÖNCKEBERG, F. Y MUZZO, S. (2015). La desconcertante epidemia de obesidad. *Revista chilena de nutrición*, 42(1), 96-102.

MORENO, M. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), 124-128.

NATURIL-ALFONSO, C.; LAVARA, R.; VICENTE, J. Y MARCO-JIMÉNEZ, F. (2017). Effects of Female Dietary Restriction in a Rabbit Growth Line During Rearing on Reproductive Performance and Embryo Quality. *Reproduction In Domestic Animals*, 51(1), 114-122.

NATURIL-ALFONSO, C.; PEÑARANDA, D.; VICENTE, J. Y MARCO-JIMÉNEZ, F. (2017). *Feed restriction regime in a rabbit line selected for growth rate alters oocyte maturation manifested by alteration in MSY2 gene expression. Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 976–984.

NICOL, A. Y MCLAREN, A. (1974). An effect of the female genotype on sperm transport in mice. *J Reprod Fertil*, 39, 421-4.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). (2019). Obesidad, visto el 7 de mayo de 2019. Disponible en: <https://www.who.int/topics/obesity/es/>

ORTIZ-MENDOZA Y VELASCO-NAVARRO. (2013). La obesidad: principal factor de riesgo para cáncer de endometrio. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 51(3):260-3.

PFÄFFL, M.W. (2004). Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR. S.A.Bustin, editor. *International University Line. La Jolla*; p. 87-112.

PICONE, O.; LAIGRE, P.; FORTUN-LAMOTHE, L.; ARCHILLA, C.; PEYNOT, N.; PONTER, A.A.; BERTHELOT, V.; CORDIER, A.G.; DURANTHON, V. Y CHAVATTE-PALMER, P. (2011). Hyperlipidic hypercholesterolemic

diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology* 75, 287– 299.

PURSEL, V.G. Y JOHNSON, L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1(2):63–68

QAMAR, W.; KHAN, M.R. Y ARAFAH, A. (2017). Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi journal of biological sciences*, 24(7), 1465–1469.

RITTENBERG, V.; SESHADRI, S.; SUNKARA, S.K.; SOBALLEVA, S.; OTENG-NTIM, E. Y EL-TOUKHY, T. (2011). Effect of body mass index on IVF treatment outcome: an updated systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*; 23:421–39.

ROCHE APPLIED SCIENCE. (2001). Technical note No. LC 13. Roche Diagnostics GmbH.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E.; PEREA, J.M.; LÓPEZ-SOBALER, A.M. Y ORTEGA, R.M. (2009). Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutrición Hospitalaria*, 24(4), 415-421.

ROMMERS, J.M.; MEIJERHOF, R.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M. Y KEMP, B. (2002). Relationship between body weight at first mating and subsequent body development, feed intake, and reproductive performance of rabbit does. *J Anim Sci* 80, 2036– 2042.

RUIZ, L.; ESPINOSA, R.; FRAGOSO, I.; RODRÍGUEZ, A.; GONZÁLEZ, H.; ARRIETA, I.; TARRAGÓ, M.R.; ARTEAGA, M. Y ARENAS, E. (2016). Efecto de la obesidad en la fertilidad masculina. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3), 44 – 51.

SAACKE, R.G.; NEBEL, R.L.; KARABINUS, D.S.; BAME, J.H. Y MULLINS, J. (1998). Sperm transport and accessory sperm evaluation. *Proc. 12th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod., Milwaukee*, pp. 7-11. Columbia, MO: Natl. Assoc. Anim. Breed.

SAENZ-DE-JUANO, M.; MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VICENTE, J. (2016). Embryo transfer manipulation cause gene expression variation in blastocysts that disrupt implantation and offspring rates at birth in rabbit. *European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology*, 207, 50-55.

SAKURAI, T.; WATANABE, S.; KAMIYOSHI, A.; SATO, M. Y SHINDO, T. (2014). A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC biotechnology*, 14(1), 69.

SALVETTI, P.; THEAU-CLÉMENT, M.; BECKERS, J.F.; HURTAUD, J.; GUERIN, P.; NETO, V.; FALIÈRES, J. Y JOLY, T. (2007). Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67(6): 1185-1193.

SCHISTERMAN, E.F.; MUMFORD, S.L.; BROWNE, R.W.; BARR, D.B.; CHEN, Z. Y LOUIS, G.M. (2014). Lipid concentrations and couple fecundity: the LIFE study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 99(8), 2786–2794.

SENGOKU, K. Y DUKELOW, R.W. (1988). Gonadotropin effects on chromosomal normality of hamster preimplantation embryos. *Biol Reprod*, 38, 150-155.

SINGH, S.; SHYAM, S.; SAH, S.; SINGH, M. Y PALTA, P. (2019). Treatment of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos with MicroRNA-29b Mimic Improves Their Quality, Reduces DNA Methylation, and Changes Gene Expression Without Affecting Their Developmental Competence. *Cellular Reprogramming*.

SODERLUND, D. (2016). Consecuencias de la obesidad en la reproducción y en el embarazo. *Rev Esp Med Quir*, 21(2), 65-71.

SQUIRES, E.L. Y MCCUE, P.M. (2007). Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci*, 99(1-2): 1-8.

STROUD, B. Y HASLER, J.F. (2006). Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*, 65(1): 65-76.

TAO, T. Y NIEMANN, H. (2000). Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(4), pp.881-889.

THOMSEN, L.; HUMAIDAN, P.; BUNGUM, L. Y BUNGUM, M. (2014). The impact of male overweight on semen quality and outcome of assisted reproduction. *Asian Journal of Andrology*, 16, 749- 754.

TSAI, E.C.; MATSUMOTO, A. M.; FUJIMOTO, W.Y. Y BOYKO, E.J. (2004). Association of bioavailable, free, and total testosterone with insulin resistance: influence of sex hormone-binding globulin and body fat. *Diabetes Care*, 27, 861-868.

TSAO, C.W.; LIU, C.Y.; CHOU, Y.C.; CHA, T.L.; CHEN, S.C. Y HSU, C.Y. (2015). Exploration of the association between obesity and semen quality in a 7630 male population. *PLoS ONE*, 10, e0119458.

VAN DER AUWERA, I. Y D'HOOGHE, T. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod*, 16, 1237-1243.

VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; MARCO, F. Y VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administrated in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76(6): 1120-1125.

VICENTE, J.S.; VIUDES DE CASTRO, M.P.; LAVARA, R. Y MOCÉ, E. (2004). Study of fertilising capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in rabbit using DNA markers. *Theriogenology*, 61(7-8), 1357-1365.

VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; POMARES, A.; SAENZ DE JUANO I RIBES, M. D.; MARCO-JIMÉNEZ, F. Y VICENTE, J. S. (2015). Effect of luteinizing hormone on rabbit ovarian superstimulation and embryo developmental potential. *Theriogenology*, 84(3), 446-451.

WANG, S.; TANG, X.; NIU, Y.; CHEN, H.; LI, B.; LI, T.; ZHANG, X.; HU, Z.; ZHOU, Q. Y JI, W. (2007). Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25: 481- 489.

YATSENKO, S. Y RAJKOVIC, A. (2019). Genetics of human female infertility. *Biology Of Reproduction*.

ZAIN, M. Y NORMAN, R. (2008). Impact of Obesity on Female Fertility and Fertility Treatment. *Women's Health*, 4(2), 183-194.

ZHANG, S. Y CUI, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World journal of stem cells*, 6(3), 305–311.

ZHAO, J.; ZHAI, L.; LIU, Z.; WU, S. Y XU, L. (2014). Leptin Level and Oxidative Stress Contribute to Obesity-Induced Low Testosterone in Murine Testicular Tissue. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2014, 1-14.

ZHENG, H.; ZHANG, C.; YANG, W.; WANG, Y.; LIN, Y.; YANG, P.; YU, Q.; FAN, J. Y LIU, E. (2009). Fat and Cholesterol Diet Induced Lipid Metabolic Disorders and Insulin Resistance in Rabbit. *Experimental And Clinical Endocrinology & Diabetes*, 117(08), 400-405.