

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



EFECTO DE LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA SOBRE LA CAPACITACIÓN DEL SEMEN DE CONEJO.

TRABAJO FIN DE GRADO DEL GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: VICENTE JAVIER BARBERÁ NAVARRO

TUTOR: JOSE SALVADOR VICENTE ANTÓN

Curso Académico: 2013-2014

VALENCIA, JULIO DE 2014

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada





**ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE
INGENIERIA
AGRONÓMICA Y DEL**

Datos personales

Alumno: Vicente Barberá Navarro

Datos del trabajo de final de grado

Título del TFG: Efecto De La Albúmina Sérica Bovina Sobre La Capacitación Del Semen De Conejo.
Lugar de realización: Dpto. Ciencia Animal
Titulación: Grado en Biotecnología
Director: Prof. D. José S. Vicente Antón
Localidad y fecha: Valencia, Julio 2014

Resumen

Se ha observado que la albúmina es un posible inductor de la capacitación espermática en mamíferos, debido a sus propiedades como solubilizante lípidos y como aceptor de esteroides. En este proyecto, el objetivo fue valorar el efecto capacitante de la albúmina sérica bovina sobre el semen del conejo con el fin de obtener un procedimiento de fecundación *in vitro* en dicha especie. Para ello, se llevaron a cabo 3 experimentos. En primer lugar, se evaluó el efecto de dos tipos de albúmina sérica, la BSA (albúmina sérica bovina) y BSA libre de ácidos grasos en una solución salina de Tyrode (TALP) sobre los espermatozoides a diferentes tiempos de incubación (2 y 4 horas). Los resultados sugerían que los medios TALP con BSA con independencia del tiempo de incubación modifican los patrones de movimiento, incrementando la frecuencia de la subpoblación espermática con signos de capacitación. En segundo experimento, se evaluó el medio TALP-BSA asociado a tres tratamientos, selección en gradiente(A), dilución del semen (B) y doble centrifugación del semen(C). Al finalizar el tratamiento, se indujo la reacción acrosómica con el ionóforo de calcio A23187. En este experimento, los espermatozoides tratados con ionóforo alteraron sus patrones de movimiento como consecuencia de un incremento en su capacidad de adherencia, probablemente debido a la reacción acrosómica inducida. El 64,4% de los espermatozoides del tratamiento con doble centrifugación pertenecían a la subpoblación que presentaba signos evidentes de reacción acrosómica. Finalmente, en el tercer experimento, se comprobó la capacidad fecundante de los espermatozoides mediante co-cultivo de óvulos en MII y espermatozoides tratados. Tras el cultivo, los espermatozoides tratados con una doble centrifugación alcanzaron la mayor tasa tanto de fecundación (51,6%) como de desarrollo a mórula o blastocisto temprano a las 96 horas de cultivo (40,3%). Los resultados de estos experimentos demostraron que el uso de la albúmina sérica bovina, en combinación con solución TALP y una doble centrifugación, tienen un efecto capacitante sobre los espermatozoides de conejo. Sin embargo, esta capacitación es insuficiente para lograr tasas elevadas de fecundación *in vitro* en esta especie.

Palabras clave

Capacitación, semen, conejo, fecundación *in vitro*, albúmina sérica bovina.

Abstract

It has been observed that bovine serum albumin is a potential inductor of sperm capacitation in mammals due to its properties as a lipid solubilizer and sterol acceptor. In this project, the objective was to determine the capacitating effect of the bovine serum albumin in rabbit semen with the purpose of obtaining an *in vitro* fertilization proceeding in the mentioned species. For this, three different experiments were carried out. In the first place, in a Tyrode saline solution (TALP), the effect on sperm of two different types of BSA: the BSA (Bovine serum albumin) and the fatty acids free BSA, at different incubation times (2 and 4 hours) was assessed. This experiment demonstrated that the common BSA offered better capacitating results over rabbit sperm on the BSA-FV, increasing the subpopulation that showed capacitation signs. The incubation times did not affect. In the second experience, three different treatments were assessed with the TALP-BSA medium: sperm selection (A), sperm dilution (B) and semen double centrifugation (C). At the end of the treatment, acrosomic reaction was induced with calcium ionophore A23187 in order to evaluate the *in vitro* capacitation. In this experiment, was observed that the ionophore altered the sperm motile patterns, as a result of an increase in their adherence capability, probably due to an inducted acrosomic reaction. 64.4% of sperm treatment with double centrifugation belonged to the subpopulation that showed obvious signs of acrosome reaction. Finally, in the third experiment, the fertilizing capacity of sperm by co-culture of oocytes in MII and treated sperm was ascertained. After culture, sperm treated with a double centrifugation reached both the highest fertilization rate (51.6%) and development to morula or early blastocyst at 96 hours of culture (40.3%). The results of these experiments demonstrated that the use of bovine serum albumin in combination with TALP solution and centrifuging twice, have effect on sperm capacitation rabbit. However, this training is insufficient to achieve high rates of *in vitro* fertilization in this species.

Key Words

Capacitation, semen, rabbit, *in vitro* fertilization, bovine serum albumin

Agradecimientos

Primeramente agradezco a José S. Vicente, tutor del proyecto, por su paciencia, opiniones y buenos consejos, así como por permitirme formar parte de su grupo de trabajo e iniciarme en el mundo de la investigación. También agradezco a Amparo, por su ayuda durante todo el proyecto, paciencia para contestar mis infinitas preguntas, y enseñarme la forma de trabajar, correcta y metódica, de un laboratorio de investigación.

Gracias a Mara, Carmen, Estrella, Pilar, Raquel, Paco y Luis, así como a todos los miembros del departamento de Ciencia Animal y del CITA-IVIA, por la ayuda que me habéis brindado siempre que la he necesitado y por hacerme sentir cómodo desde el primer momento.

Gracias a mi familia y a mi novia, por su apoyo constante e incondicional, consejos, ayuda y paciencia conmigo durante esta etapa de mi vida, sin vosotros hubiese sido imposible seguir adelante.

Finalmente agradezco a todos los profesores que me han brindado ayuda y consejo a lo largo de este proyecto, y a la Universidad Politécnica de Valencia por las oportunidades y conocimientos que me ha ofrecido en el transcurso de mi formación.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Bases moleculares de la capacitación	1
1.1.1. Metabolismo energético	2
1.1.2. Modificaciones de los canales de iones y eventos de fosforilación asociados a la capacitación	2
1.1.3. Alteraciones lipídicas en la capacitación espermática	3
1.1.4. Modificaciones durante la reacción acrosómica	4
1.2. Métodos de selección de espermatozoides	5
1.2.1. Swim-up	5
1.2.2. Centrifugación en gradientes de sílice coloidal	5
1.2.3. Filtración en fibra de vidrio	5
1.3. Agentes inductores de la capacitación espermática	5
1.3.1. Células del cúmulo.....	6
1.3.2. Medio Tyrode libre de calcio.....	6
1.3.3. Albúmina sérica bovina (BSA).....	6
1.3.4. Fluido folicular y oviductal	7
1.3.5. Heparina y otros glucosaminoglucanos (GAG).....	7
1.4. Agentes inductores de la reacción acrosómica.....	7
1.4.1. Ionóforo de calcio (A23187)	8
1.4.2. Liposomas de fosfatidilcolina.....	8
1.4.3. Aminoácidos y catecolaminas	8
1.5. Fecundación <i>in vitro</i> en conejo	9
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Animales.....	11

3.2.	Recogida del semen	11
3.3.	Evaluación del semen	12
3.3.1.	Valoración macroscópica	12
3.3.2.	Valoración microscópica.....	13
3.4.	Experimento 1. Evaluación del efecto de los medios TALP con albúmina sérica bovina y el tiempo de incubación sobre las características del semen de conejo	16
3.5.	Experimento 2. Evaluación del efecto de la albúmina sérica bovina sobre la capacitación y reacción acrosómica del semen de conejo	17
3.6.	Experimento 3. Evaluación <i>in-vivo</i> de la capacitación.....	19
3.6.1.	Obtención de los ovocitos	19
3.6.2.	Fecundación <i>in vitro</i>	20
3.7.	Análisis estadístico.....	21
3.7.1.	Obtención y análisis de las subpoblaciones espermáticas	21
3.7.2.	Análisis de los parámetros espermáticos y las tasas de fecundación y desarrollo.....	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1.	Experimento 1. Evaluación del efecto de los medios TALP con albúmina sérica bovina y el tiempo de incubación sobre las características del semen de conejo.....	23
4.2.	Experimento 2. Evaluación del efecto de la albúmina sérica bovina sobre la capacitación y reacción acrosómica del semen de conejo	25
4.3.	Experimento 3. Evaluación <i>in-vivo</i> de la capacitación.....	28
5.	CONCLUSIONES	31
6.	BIBLIOGRAFÍA	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conejo de la raza New Zealand White	11
Figura 2. Fotografía de 4 vaginas artificiales de plástico (izquierda), relleno de una de las vaginas con una jeringa con agua a 45°C (derecha).....	12
Figura 3. Recuperación del eyaculado utilizando una vagina artificial.....	12
Figura 4. Eliminación del tapón de gel de algunos eyaculados.	13
Figura 5. Parámetros de motilidad espermática.....	15
Figura 6. Esquema experimento 1	16
Figura 7. Semen seleccionado	17
Figura 8. Esquema del Experimento 2	18
Figura 9. Esquema del Experimento 3. FIV	20
Figura 10. Cultivo de los cigotos hasta 96 horas.	29

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de motilidad, viabilidad y acrosomía en función del tiempo.....	23
Tabla 2. Características de velocidad y trayectoria de las subpoblaciones analizadas.	24
Tabla 3. Análisis de subpoblaciones espermáticas para los diferentes medios utilizados.	25
Tabla 4. Parámetros de motilidad, y acrosomía para las muestras tras los diferentes tratamientos e incubación con ionóforo de calcio A23187.	26
Tabla 5. Características de velocidad y trayectoria de las subpoblaciones analizadas	27
Tabla 6. Análisis de subpoblaciones espermáticas para los diferentes medios utilizados.....	27
Tabla 7. Resultados de la fecundación in-vitro.....	29

INDICE DE ABREVIATURAS

ALH: amplitude of lateral head displacement about its average path.

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.

ATP: adenosin trifosfato.

BCF: beat cross frequency.

BOE: boletín oficial del estado.

BSA: bovine serum albumin.

CASA: computer-assisted sperm analysis.

DM: defined medium.

DPBS: Dulbecco's phosphate buffered saline.

FBS: fetal bovine serum.

FitC-PNA: fluorescein isothiocyanate labeled Peanut Agglutinin.

FIV: fecundación *in vitro*.

GAG: glucosaminoglucanos.

HIS: high ionic strength.

LIN: linearity index.

MII: metaphase II.

NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado.

rhFSH: recombinant human follicle-stimulating hormone.

rhLH: recombinant human luteinizing hormone.

STR: straightness coefficient.

VAP: average path velocity.

VCL: curvilinear velocity.

VSL: straight line velocity.

WOB: wobble.

1 INTRODUCCIÓN

- 1.1. Bases moleculares de la capacitación**
- 1.2. Métodos de selección de espermatozoides**
- 1.3. Agentes inductores de la capacitación espermática**
- 1.4. Agentes inductores de la reacción acrosómica**
- 1.5. Fecundación *in vitro* en conejo**

1. INTRODUCCIÓN

Al contrario que en otros vertebrados, los espermatozoides de los mamíferos deben adquirir la capacidad de fecundar el ovocito en el momento y lugar precisos (Austin, 1951 y Chang, 1951). El espermatozoide pasa a ser “competente para la fecundación” tras permanecer en las vías reproductivas de la hembra y sufrir una serie de modificaciones bioquímicas y metabólicas mediadas fundamentalmente por las secreciones uterinas y oviductales, y que preceden a los fenómenos de hiperactivación y reacción acrosómica, modificaciones previas que en su conjunto reciben el nombre de capacitación (Fraser, 1998).

La capacitación ha sido asociada con cambios en la concentración intracelular de iones en el espermatozoide, fluidez de la membrana plasmática, metabolismo y motilidad espermática (Visconti *et al.*, 1995).

En el estado capacitado, se producen alteraciones en el patrón de movimiento del flagelo. Este cambio implica la transición de motilidad progresiva, con curva de baja amplitud en el movimiento flagelar a motilidad hiperactiva, característica por su amplia amplitud en la curva dibujada por el flagelo. Esta hiperactivación flagelar facilita la progresión del espermatozoide en el oviducto, hasta alcanzar el ovocito, atravesar el cúmulo y adherirse a la zona pelúcida (Katz, 1998; DeMott, 1992).

Además, los espermatozoides capacitados pueden responder a las señales moleculares dadas por el ovocito y sus envolturas asociadas (cúmulo y zona pelúcida) lo que provoca la reacción acrosómica. Ésta consiste en una reacción exocitótica que conlleva por una parte la liberación de enzimas que facilitarían el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida, y por otra, cambios en la membrana plasmática del espermatozoide que le permitirán adherirse y atravesar la membrana del ovocito (Yamaginachi, 1994).

1.1. Bases moleculares de la capacitación

Como se ha citado anteriormente, durante el proceso de capacitación se producen una serie de alteraciones bioquímicas en la célula. Estas alteraciones, que describiremos a continuación, engloban el metabolismo energético del espermatozoide, así como cambios estructurales asociados a los cambios lipídicos en las membranas, alteraciones de los canales de iones, modulación de la actividad de ciertas enzimas, y la fosforilación de proteínas (Visconti *et al.*, 2011).

1.1.1. Metabolismo energético

La hiperactivación del espermatozoide cuando se halla en estado capacitado se caracteriza por un incremento en la amplitud de la curvatura flagelar y pérdida de simetría de movimiento. Este fenómeno se da de forma natural en los espermatozoides ya que previsiblemente favorece su desplazamiento por el oviducto, la adhesión al complejo cúmulo-ovocito y finalmente, tras la reacción acrosómica, alcanzar la membrana ovocitaria (Austin y Bishop, 1958). Esta actividad espermática requiere la fosforilación de proteínas relacionadas con la transducción de señales y la conversión de energía química en energía mecánica en el axonema mediante la oxidación de sustratos energéticos (Ferramosca y Zara, 2014).

Debido a ello, la fosforilación oxidativa de mitocondrias y la glicólisis son dos rutas metabólicas fundamentales por su aporte de ATP. La fosforilación oxidativa ocurre en las mitocondrias, y estas se hallan en la pieza intermedia, viéndose incrementada en gran medida durante la capacitación (Stendardi *et al.*, 2011). Por otra parte, la glicólisis tiene lugar en las vainas fibrosas del flagelo, donde están las enzimas glicolíticas firmemente ancladas. Esto es debido a que la pieza principal del flagelo contiene gran cantidad de enzimas glicolíticas como las hexoquinasas, fosfoglucoquinasa isomerasas, fosfofructoquinasas, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y aldolasas (Krisfalusi *et al.*, 2006).

En términos de metabolismo energético, durante la capacitación espermática, el lactato y el piruvato ejercen un papel fundamental, estas moléculas, junto con la glucosa están presentes en altas concentraciones en el fluido oviductal, (Ruiz-Pesini *et al.*, 2007, Piomboni *et al.*, 2012). El metabolismo del piruvato está profundamente relacionado con el de lactato, puesto que éste deriva de la reducción enzimática del piruvato por la lactato deshidrogenasa. Esta reacción, especialmente en condiciones anaerobias genera dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) en el citosol, el cual es fundamental para que la glicólisis se lleve a cabo. Además, el lactato citosólico también es utilizado, esta molécula se ve transportada a las mitocondrias del espermatozoide, donde existe una isoenzima del lactato deshidrogenasa la cual reoxida ese lactato a piruvato (Ferramosca y Zara, 2014).

1.1.2. Modificaciones de los canales de iones y eventos de fosforilación asociados a la capacitación

El espermatozoide utiliza parte sus recursos energéticos en el mantenimiento y construcción de los gradientes de concentración de iones a través de la membrana, gracias al uso de bombas y transportadores de iones transmembrana (Hille, 2001). Al contrario que en otros fluidos

corporales, el lumen del epidídimo contiene bajos niveles de iones Na^+ , mayores niveles de K^+ y niveles inferiores de Cl^- , estando compensada esta osmolaridad gracias a los aniones orgánicos como la carnitina, la fosfocolina y la glicerilfosforilcolina (Visconti *et al.* 2011). Además, el pH del lumen del epidídimo es bajo gracias a una secreción de iones H^+ del epitelio y el consumo de HCO_3^- . Estos bajos niveles de pH son fundamentales para mantener de forma competente la funcionalidad de los espermatozoides.

La capacitación y la hiperactivación se llevan a cabo durante el tránsito del espermatozoide en el tracto reproductor femenino, donde las concentraciones de iones variarán, disminuyendo los niveles de K^+ , y aumentando los niveles del HCO_3^- y del Na^+ . Estas concentraciones son especie-específicas y mediante la regulación de estas concentraciones de iones por parte de los espermatozoides, éstos alcanzan el estado capacitado, por lo que resulta imprescindible en cualquier medio de capacitación para fecundación *in vitro* niveles específicos de los iones Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++} and HCO_3^- .

Como se ha mencionado anteriormente, existe un cambio crítico en los niveles de HCO_3^- tras la eyaculación y este ion cobra una especial relevancia en la regulación del pH y el potencial de membrana. En relación con ello existe una conexión entre la concentración de HCO_3^- y la ruta del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), siendo la fosforilación dependiente de AMPc imprescindible en la capacitación del espermatozoide (Gadella, 2008). Los niveles de AMPc sólo se regulan mediante el Ca^{++} cuando existe bicarbonato en el medio (Visconti *et al.*, 2011). También se demostró en semen de verraco que el HCO_3^- es necesario para iniciar la motilidad de los espermatozoides, así como la concentración de dicho ion es capaz de incrementar los niveles de AMPc debido a la estimulación directa de un tipo único de adenil ciclasa presente en el semen (Okamura *et al.*, 1985).

1.1.3. Alteraciones lipídicas en la capacitación espermática

La integridad de la membrana es fundamental para mantener la función normal de la célula, ya que de ella depende el paso de moléculas o iones hacia el interior y hacia el exterior de la célula. En la estabilidad de las membranas plasmáticas intervienen interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína, así como la acción de tres enzimas: flipasa, flopasa y escramblasa, que median los movimientos de los fosfolípidos de forma ATP y Calcio-dependiente (Contreras *et al.*, 2010). La escramblasa se activa con un incremento del calcio intracelular y, de forma muy rápida, induce una aleatorización de la distribución de fosfolípidos. En el espermatozoide, el “scrambling” se observa como un evento temprano de la capacitación (Gadella y Harrison, 2000). El análisis de los fosfolípidos y sus movimientos invitan a pensar en el colapso de la asimetría de la membrana debido a un aumento en la actividad de las escramblasas. Además, este cambio en

la distribución de fosfolípidos parece ser estimulado las concentraciones de Ca^{++} y HCO_3^- , mediado por la ruta de la proteína kinasa A y el AMPc y realizado por los inhibidores de la proteína fosfatasa. Este fenómeno se ha relacionado con la necesidad de albúmina sérica durante este proceso, ya que el “scrambling” de los fosfolípidos podría facilitar el secuestro de colesterol mediado por la albúmina (Gadella y Harrison, 2000). La albúmina sérica, además, podría tener otras funciones durante la capacitación, como la promoción del influjo de Ca^{++} , Aunque en diversos estudios se ha observado que otros compuestos ejercen la misma función, como las lipoproteínas de alta densidad y β -ciclodextrinas (Visconti *et al.*, 2011).

1.1.4. Modificaciones durante la reacción acrosómica

La membrana plasmática se ve afectada durante la capacitación siendo visibles diversos cambios como son la gradual eliminación o alteración de las glicoproteínas periféricas, la reordenación de las proteínas integrales, reducción del colesterol de membrana, cambios en la distribución y composición de los fosfolípidos o la disminución de la negatividad en la carga de la membrana (Zeng *et al.* 1995).

Dentro de las alteraciones bioquímicas de la membrana plasmática cobra especial importancia la reacción acrosómica.

La reacción acrosómica se trata de un evento de exocitosis producido por la fusión de dos membranas. Esto ocurre cuando el espermatozoide capacitado se une a la zona pelúcida del ovocito y se ve estimulado por diversos factores, como la interacción con la progesterona y ZP3. Esta reacción concluye con la exocitosis del contenido acrosomal (Belmonte *et al.*, 2005).

Esta reacción acrosómica se produce con la liberación de las enzimas hidrolíticas que permiten la penetración de la zona pelúcida y que se activa por señales durante la capacitación. Para hacer posible esta reacción, el espermatozoide debe atravesar el *cumulus oophorus*, y hacer un reconocimiento especie-específico de la zona pelúcida (Gadella, 2008).

Los receptores de la membrana plasmática se unen a la zona pelúcida mediante interacciones proteína-proteína, por medio de la tirosin kinasa, o proteína-carbohidrato, lo cual lleva a la activación de la fosfolipasa C y a la producción de cAMP. A su vez, los canales dependientes de calcio de la membrana externa se abren, expulsando calcio del interior del acrosoma hacia el medio externo, lo que conlleva a una modificación de los niveles de pH y provoca la despolarización de la membrana y de la actina del citoesqueleto. Esta apertura de los canales de calcio desemboca en la fosforilación de las proteínas y la fusión de las membranas (Florman *et al.*, 1992).

Durante la reacción acrosómica la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa se fusionan, dejando expuesta la membrana acrosomal interna. Mediante este proceso el espermatozoide es capaz de penetrar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Boiti *et al.*, 2005).

1.2. Métodos de selección de espermatozoides

Cuando se pretende realizar una fecundación *in vitro* (FIV), se requiere de técnicas *in vitro* que simulen lo que ocurre en las vías reproductivas de la hembra, asumiendo que una mejor motilidad y morfología ofrecerán un semen con mayores posibilidades de fecundar. Siendo las técnicas más frecuentes:

1.2.1. Swim-up

El eyaculado es diluido en un medio de capacitación y centrifugado en un gradiente de densidades en torno a 500g para formar un sedimento de espermatozoides seleccionados. La población de espermatozoides móviles que migra desde el sedimento formado hacia el sobrenadante será seleccionada para FIV (Jameel, 2008).

1.2.2. Centrifugación en gradientes de sílice coloidal

Se basa en la separación de espermatozoides móviles en gradientes de distinta densidad sobre la base de su motilidad progresiva. Los espermatozoides morfológicamente más aptos para fecundar penetran en los gradientes más densos cuando son centrifugados, quedando tras la centrifugación en las fases superiores los detritus y los espermatozoides anormales, inmaduros y muertos (menos densos), y en el pellet los morfológicamente más aptos (más densos). (Parrish *et al.*, 1995 y Grasa *et al.*, 2004).

1.2.3. Filtración en fibra de vidrio

Esta técnica se basa en hacer pasar a los espermatozoides por una columna de fibra de vidrio. En dicha columna los espermatozoides muertos o con defectos en la membrana se adhieren a las fibras de vidrio quedando retenidos. Este sistema no está aconsejado cuando se parte de muestras sucias o con intensa oligoastenozoospermia. Sin embargo, el filtrado en fibra de vidrio se realiza más rápidamente que las técnicas anteriores, suscitando una menor pérdida de espermatozoides, siendo muy eficaz en muestras con gran viscosidad (Grunewald *et al.*, 2007).

1.3. Agentes inductores de la capacitación espermática

Tras seleccionar una subpoblación de espermatozoides morfológicamente normales y móviles, éstos deben ser capacitados. La capacitación puede ser lograda con la exposición de los

espermatozoides a diferentes sustancias o a productos que segregan las células, como las del cúmulo. No obstante, el método a utilizar depende en ocasiones no sólo de la especie sino del macho utilizado. Por ello se han descrito numerosos métodos adaptados según la especie, tipo de semen e incluso al donante. Los métodos que se utilizan con más frecuencia contienen:

1.3.1. Células del cúmulo

Las células *cumulus oophorus* se definen como el conjunto de células que rodean el ovocito antes y después de la ovulación. La presencia del cúmulo alrededor de los ovocitos maduros no es esencial para la FIV pero puede facilitar la fecundación ya que algunos componentes del cúmulo pueden promover la reacción acrosómica de los espermatozoides, pudiendo subsanar las deficiencias de los sistemas de capacitación (Tesarik, 1985). Las hormonas esteroideas, y concretamente la progesterona que son liberadas por las células del cúmulo, son potentes estimulantes de los espermatozoides, atrayendo a los mismos y ayudándolos a penetrar las cubiertas ovocitarias. La progesterona induce el influjo de calcio y provoca una serie de respuestas esenciales para la fecundación, tales como la activación, reacción acrosómica y quimiotaxis hacia el ovocito.

1.3.2. Medio Tyrode libre de calcio

Este medio se trata de una solución salina con cloruro sódico y potásico, sulfato de magnesio y bicarbonato sódico (pH: 7,6). Debido a la presencia de estos iones, la osmolaridad y el pH permiten las modificaciones de membrana que favorecen la entrada de calcio (Coy, 2002). En estudios anteriores (Ijaz y Hunter, 1989) demostraron que con la solución de Tyrode original provista de iones calcio, los espermatozoides no podían penetrar la zona pelúcida del ovocito, ya que el calcio podría bloquear la activación enzimática, disminuir la fluidez de membrana y alterar la carga de la superficie de la misma. Por ello, mediante la eliminación del calcio de la solución de Tyrode logró estimular al espermatozoide para que se dieran los cambios necesarios para la capacitación y la posterior reacción acrosómica, ya que debido a su ligeramente superior nivel de pH se impedía la necesidad de calcio intracrosomal (Ijaz y Hunter, 1989). Otro factor importante del medio Tyrode utilizado fue la elevada cantidad de bicarbonato que poseía, ya que como se ha comentado anteriormente, el bicarbonato sódico era un elemento importante en la bioquímica de la capacitación.

1.3.3. Albúmina sérica bovina (BSA)

Se ha visto cómo la presencia de BSA mejora la tasa de fecundación en diversas especies: ratones, marmotas y vacuno (Go y Wolf, 1985). Ésta podía jugar un papel clave en la eliminación del

colesterol y zinc de los espermatozoides. Ha habido trabajos donde, al usarse un medio suplementado con BSA, se reducían los contenidos de esteroides en las células, además de afectar el nivel de los fosfolípidos de la membrana. Es por ello que la BSA es incluida de forma rutinaria en los medios de cultivo utilizados para la FIV (Stewart-Savage, 1993).

En estudios previos como los de Go y Wolf (1985) se utilizaron diferentes tipos de BSA dependiendo de las fracciones empleadas en el medio, entre ellos cabe destacar la BSA libre de ácidos grasos (FAF-BSA), la BSA de fracción V obtenidas ambas mediante ácido tricloroacético y la BSA enriquecida con colesterol. En este estudio se utilizaron las distintas BSAs y se suplementaron con un tampón bicarbonato (Krebs Ringer Buffer, KRB), glucosa y lactato (Inoue y Wolf, 1975). Tras la incubación en dicho medio tamponado con BSA se observó que el medio con BSA enriquecido con colesterol no era capaz de soportar la capacitación espermática debido a que la actividad aceptora de esteroides de esta proteína era crítica, siendo la BSA ausente de lípidos obtenido de la fracción V la que mejores resultados ofreció sobre la capacitación *in vitro* del esperma murino.

1.3.4. Fluido folicular y oviductal

El fluido folicular (FF) de varias especies de mamíferos puede inducir la capacitación debido a la presencia de glucoaminoglucanos, y albúmina (McNutt y Killian, 1991).

1.3.5. Heparina y otros glucosaminoglucanos (GAG)

Varios GAG han sido identificados en el tracto genital femenino, siendo considerados como efectivos inductores de la capacitación. La concentración de GAG en el tracto reproductor femenino decrece desde el cérvix hacia las regiones anteriores, observándose cambios en la concentración y composición de estos durante el ciclo estral de la hembra. La heparina es el GAG más potente a la hora de inducir la capacitación en espermatozoides bovino (Dapino *et al.*, 2006). En esta especie, la heparina se une a la membrana mediante una unión del tipo ligando-receptor probablemente mediante proteínas de unión de la membrana procedentes del plasma seminal, reduciendo la actividad de la calcio-ATPasa y permitiendo la entrada de calcio extracelular.

1.4. Agentes inductores de la reacción acrosómica

Como hemos comentado anteriormente, la reacción acrosómica es un prerequisite fundamental para la interacción de las membranas del espermatozoide con el oolema del ovocito. Los agentes más comunes para inducir la reacción acrosómica son los siguientes:

1.4.1. Ionóforo de calcio (A23187)

El ionóforo incrementa directamente el contenido del calcio intracelular del espermatozoide induciendo así la apertura de los canales calcio de la membrana externa, alterando el pH y provocando la despolarización de la membrana y la actina presente en el citoesqueleto. Así el ionóforo de calcio provoca la reacción acrosómica (Tateno *et al.*, 2013).

1.4.2. Liposomas de fosfatidilcolina

Se ha demostrado que las cadenas de ácidos grasos de 10 (PC10) o 12 carbonos (PC12) son efectivos inductores de la reacción acrosómica de espermatozoides bovinos (Thérien *et al.*, 1995) y porcino (Friend *et al.*, 1977). En estos trabajos se observó que la unión de liposomas de fosfatidilcolina inducía la reacción acrosómica debido a que las membranas se volvieron receptivas a la unión interfásica, haciéndolas más propensas a la fusión de las membranas externa e interna del acrosoma y a la liberación de los enzimas hidrolíticos.

1.4.3. Aminoácidos y catecolaminas

Los aminoácidos y las catecolaminas más comúnmente utilizadas son: hipotaurina, penicilamina y epinefrina (PHE) (Gordon y Lu, 1990). En conjunto es ampliamente utilizado como estimulante de la motilidad espermática. Es habitual en muchos protocolos la incubación de los espermatozoides en presencia de hipotaurina y epinefrina lo que produce una estimulación de la motilidad de los espermatozoides e induce la reacción acrosómica (Meizel *et al.*, 1980).

La hipotaurina se trata de un Beta-aminoácido azufrado el cual permite mantener una buena motilidad espermática, así como incrementar la motilidad y penetración del ovocito. La forma de actuar de este compuesto se basa en la protección de los lípidos a la peroxidación y en promover a los espermatozoides a formar agregados, siendo su único inconveniente sus largos tiempos de incubación (Álvarez *et al.*, 1983).

El efecto de la penicilamina en cambio, es el de quelar los cationes divalentes, como el zinc, ya que este es capaz de inhibir la capacitación y mantener los espermatozoides en un estado quiescente. Además la penicilamina junto con la epinefrina se ha demostrado que incrementan el porcentaje de espermatozoides que sufren la reacción acrosómica (Meizel & Working, 1980).

Por otra parte, la epinefrina es una catecolamina que, aparte de estimular la motilidad del espermatozoide, induce la reacción acrosómica y mejora la penetración de los ovocitos. En estudios como los de Leibfried y Bavister (1982), en cambio, se ha observado el requerimiento de una incubación previa en un medio con hipotaurina para que dicha acción sea posible. En este

estudio se demostró que la combinación de estos compuestos aumenta tanto las tasas de penetración como la de formación del pronúcleo masculino.

1.5. Fecundación *in vitro* en conejo

La fecundación *in vitro* consiste en el co-cultivo de ovocitos maduros con espermatozoides capacitados. Uno de los medios más utilizados para especies ganaderas como la ovina y la bovina es el TALP (medio Tyrode modificado, albúmina, lactato sódico, hipotaurina, epinefrina y/o piruvato) (Coy *et al.*, 2002), pudiendo adicionarse HEPES (15-25mM), aunque puede llegar a afectar el desarrollo embrionario temprano. En la especie del conejo, en cambio, existe una gran variación en los medios empleados por los diferentes autores. El uso de medios definidos básicos y la suplementación con medios de fuerza iónica (HIS) han sido frecuentemente utilizados por autores como Bracket y Oliphant logrando un 30% de desarrollo hasta el estadio de blastocisto.. Por otro lado en trabajos como los de Zeng *et al.* (1999) se puede ver cómo la heparina, presente en otros medios de FIV de especies ganaderas, no da ningún resultado. En conejo, en cambio, en este mismo trabajo, y mediante la centrifugación del semen en una solución muy concentrada en NaCl y bicarbonato y tras un envejecimiento de 8 a 12h del semen, se lograban tasas de fecundación y desarrollo hasta blastocisto de un 85%.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Se pretende valorar el efecto capacitante de la albúmina sérica bovina sobre el semen del conejo para obtener, de este modo, un procedimiento de fecundación *in vitro* rápido y eficiente para dicha especie

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

3.2. Recogida del semen

3.3. Evaluación del semen

3.4. Experimento 1. Evaluación del efecto de los medios TALP con albúmina sérica bovina y el tiempo de incubación sobre las características del semen de conejo.

3.5. Experimento 2. Evaluación del efecto de la albúmina sérica bovina sobre la capacitación y reacción acrosómica del semen de conejo.

3.6. Experimento 3. Evaluación *in-vivo* de la capacitación.

3.7. Análisis estadístico

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Se utilizaron 20 machos adultos (8-12 meses de edad) y 12 conejas nulíparas (4,5-5 meses de edad) pertenecientes a la línea A (New Zealand White) (Figura 1). Diez machos estuvieron alojados en la granja experimental del CITA (IVIA), centro en el que se realizó el primer experimento, y 10 machos y las 12 conejas se tuvieron alojados en las instalaciones del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Todos los animales fueron manejados y tratados de acuerdo con los principios de bienestar y manejo de los animales utilizados para fines científicos, publicados en el Real Decreto Español 53/2013 (BOE, 2013).



Figura 1 Conejo de la raza New Zealand White

3.2. Recogida del semen

Los eyaculados de 5 machos se recuperaron mediante el procedimiento de vagina artificial. Las vaginas artificiales empleadas para la recuperación del semen en conejo estaban constituidas por dos cuerpos; uno rígido (parte externa de la vagina) y uno semirrígido (parte interna) o camisa, generalmente de látex. Entre ambas se introdujo agua caliente para proporcionarle a la vagina artificial una temperatura de 45°C, similar al tracto reproductor femenino y adecuada para estimular la eyaculación sin provocar efectos adversos sobre los espermatozoides. Además, otra ventaja de este sistema es que el revestimiento interior cuando lleno de líquido permite alcanzar una presión similar a la que ejerce el tracto de la hembra sobre el pene (Figura 2).



Figura 2. Fotografía de 4 vaginas artificiales de plástico (izquierda), rellenado de una de las vaginas con una jeringa con agua a 45°C (derecha).

Una vez el conejo eyaculó al contacto con la camisa de la vagina, el eyaculado se recogió con un tubo colector (Figura 3).



Figura 3. Recuperación del eyaculado utilizando una vagina artificial.

Durante las sesiones de trabajo, tras la recuperación del semen, todos los eyaculados fueron mezclados y distribuida la mezcla entre los diferentes grupos experimentales.

3.3. Evaluación del semen

3.3.1. Valoración macroscópica

Inmediatamente tras la recogida de las muestras, se realizó una primera valoración del color, desechándose aquellos eyaculados que presentaban algún tipo de precipitado, agua u orina. Un color distinto al blanco nacarado era descartado. En aquellos eyaculados que presentaban gel, éste era retirado mediante la ayuda de unas pinzas (Figura 4).



Figura 4. Eliminación del tapón de gel de algunos eyaculados.

Posteriormente, se realizaba la lectura del volumen de cada eyaculado con una pipeta Pasteur.

3.3.2. Valoración microscópica

Tras la valoración macroscópica de los eyaculados, se tomó una muestra que fue diluida 1:10 con una solución Tris-Cítrico-Glucosa suplementado con 0,2% de BSA, para valorar la motilidad y viabilidad subjetiva.

3.3.2.1. Concentración

Se tomó una alícuota del *pool* y se fijó siguiendo el protocolo descrito por Pursel and Johnson (1974) mediante una dilución 1:10 con glutaraldehído (Glutaraldehído al 2% en solución tamponada fosfato). La determinación del número de espermatozoides por mililitro se realizó por recuento en una cámara Thoma. Tras agitar la dilución se depositaba el semen en la cámara Thoma con la ayuda de una pipeta Pasteur y se inició el recuento de las diagonales. La concentración de espermatozoides por mililitro era el resultado de multiplicar el número de espermatozoides en 40 cuadros por el factor de dilución (10), y por el factor de la cámara empleada (100.000).

3.3.2.2. Porcentaje de espermatozoides con formas anormales y estado del acrosoma

A partir la anterior dilución de semen fijada con glutaraldehído para contar concentración, la morfología espermática se valoró mediante recuento de al menos 100 espermatozoides y el resultado se expresó en porcentaje, reflejando el número de espermatozoides morfológicamente anormales.

Simultáneamente se efectuó sobre la misma muestra el control sobre el estado de los acrosomas. El criterio utilizado para determinar el estado del acrosoma se basó en la observación del borde apical del mismo, distinguiendo entre acrosomas normales y acrosomas dañados (englobando el

resto de los distintos estados de la estructura acrosómica). El resultado se expresó en porcentaje, reflejando el número de espermatozoides con acrosomas normales.

El control de las formas anormales y la estructura acrosómica se realizó mediante microscopía óptica de contraste de fases a 400X.

3.3.2.3. Motilidad

Inmediatamente tras la recuperación se evaluaron los parámetros de motilidad mediante el sistema automático CASA (Computer Assisted Semen Analysis) (VIMAS, Microptic®, Barcelona) para asegurarnos de una evaluación de la motilidad totalmente objetiva. Para ello el semen fue diluido en TRIS-Cítrico-Glucosa suplementado con 0,2% de BSA (1:20) y una alícuota de la dilución fue depositada en una cámara Makler atemperada a 37°C, se tomaron 7 imágenes que el programa analizó. En el análisis de los resultados se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF, Dance (Figura 8).

VCL: Velocidad de la cabeza del espermatozoide a través de su camino curvilíneo o velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$).

VSL: Velocidad de la cabeza del espermatozoide por una línea recta o velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$).

VAP: Velocidad de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su recorrido medio o velocidad de recorrido medio ($\mu\text{m/s}$).

LIN: La linealidad del recorrido curvilíneo (VSL/VLC).

WOB: Describe el movimiento lado a lado de la cabeza del espermatozoide.

STR: La rectitud del recorrido medio (VSL/VAP).

ALH: Amplitud de los desplazamientos laterales de la cabeza del espermatozoide en su recorrido medio ($\mu\text{m/s}$).

BCF: Frecuencia mediante VLC cruza VAP.

Dance: Área barrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su dirección principal de movimiento.

El sistema CASA debió ser especialmente configurado para el semen de conejo, ya que éste contiene una gran cantidad de partículas de origen prostático que pueden distorsionar las mediciones (superficie: $20 \mu\text{m}^2 < \text{área de la partícula} < 60 \mu\text{m}^2$, velocidad: $10 \mu\text{m/s} < \text{lentos} < 25 \mu\text{m/s} < \text{medios} < 50 \mu\text{m/s} < \text{rápidos}$, progresivos si tienen más del 70% STR, número mínimo de imágenes para calcular el ALH: 10). A pesar de ello, las secuencias de

imágenes analizadas fueron revisadas manualmente para evitar el registro de trayectorias correspondientes a varios espermatozoides o el registro de partículas como espermatozoides estáticos.

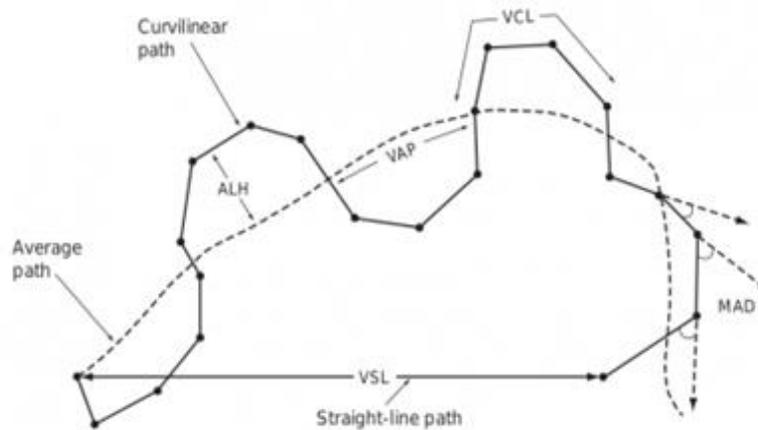


Figura 5. Parámetros de motilidad espermática.

3.3.2.4. Viabilidad

3.3.2.4.1. Tinción con Ioduro de Propidio y Syber Green

Para evaluar la viabilidad se realizó una dilución 1:20 en TRIS-Cítrico-Glucosa con 0,2% de BSA, se añadió 1 microlitro de Syber Green y de Ioduro de Propidio por cada 100 microlitros de dilución. Luego se dejó incubar 10 minutos en oscuridad y tras la incubación se adicionó glutaraldehído 1:5 para fijar la dilución.

En microscopio óptico de fluorescencia 200X se contaron un mínimo de 100 espermatozoides, en función de los colores verde o rojo según hubiesen incorporado el Syber Green (Verdes-Vivos) o el Ioduro de propidio (Rojos-Muertos).

3.3.2.4.2. Viabilidad y acrosomía con citometría de flujo

La viabilidad y el estado del acrosoma fueron medidos mediante una doble tinción y detectados con citometría de flujo.

Para la evaluación de la viabilidad se utilizaron las siguientes cantidades: 2,5µL de Syber Green, 2,5µL de Ioduro de propidio, 450µL de TRIS-Cítrico glucosa y 100µL de semen diluido 1:5 en TRIS-Cítrico glucosa.

La citometría de flujo daba como 3 posibles respuestas: Vivos (Syber Green), Muertos (Ioduro de propidio) y Apoptóticos (empezaban a integrar el Ioduro de propidio).

Para la evaluación del estado del acrosoma en los espermatozoides se recurrió a 1,5µL de isotiocinato de fluoresceína unida a la aglutinina de cacahuete (FitC-PNA), además de 2,5µL de yoduro de propidio, 450µL de TRIS-Cítrico glucosa y 100µL de semen diluido 1:5 en TRIS-Cítrico glucosa.

En acrosomía la medición mediante citometría de flujo dio 4 posibles resultados: vivos con el acrosoma intacto, muertos con el acrosoma intacto, vivos con el acrosoma reaccionado y muertos con el acrosoma reaccionado.

3.4. Experimento 1. Evaluación del efecto de los medios TALP con albúmina sérica bovina y el tiempo de incubación sobre las características del semen de conejo

Como muestra la Figura 6, para este experimento se utilizaron en cada sesión 3ml de semen obtenidos a partir de 2 eyaculados de 5 machos. Después, se evaluaron las características seminales de este *pool* de eyaculados midiendo su motilidad, concentración y formas anormales. La viabilidad y la acrosomía se evaluaron mediante citometría de flujo.

Este *pool* de eyaculados fue dividido en 3 para ser después diluido en diferentes condiciones de TALP (Tyrode's salt solution) y BSA (Bovine Serum Albumin). Se evaluaron dos tipos de BSA: La BSA extraída de la fracción V (BSA) y la BSA libre de ácidos grasos (BSA-FAF) a diferentes tiempos de incubación: 0, 2 y 4 horas.

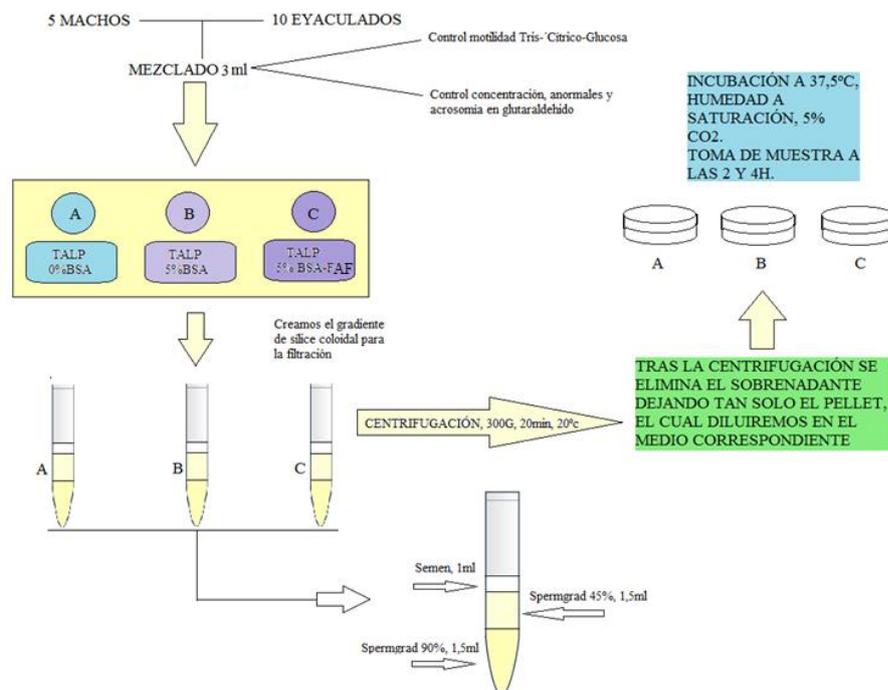


Figura 6. Esquema experimento 1

En el grupo A (control), el semen se diluyó 1:5 con solución TALP (TALP-0%BSA). En el grupo B, la dilución 1:5 del semen se realizó con una solución de TALP suplementada con un 5% de BSA-FAF (TALP-5%BSA-FAF). Finalmente, en el grupo C se diluyó 1:5 el semen en la solución TALP suplementada con un 5% de BSA (TALP-5%BSA).

Para seleccionar los espermatozoides del resto de partículas presentes en el eyaculado, las muestras diluidas fueron centrifugadas a 600g durante 20 min a 20°C. Se empleó un gradiente de densidades de sílice coloidal (SPERMGRAD™ Vitrolife ©) de 2 capas, al 45 y al 90% (Figura 6).

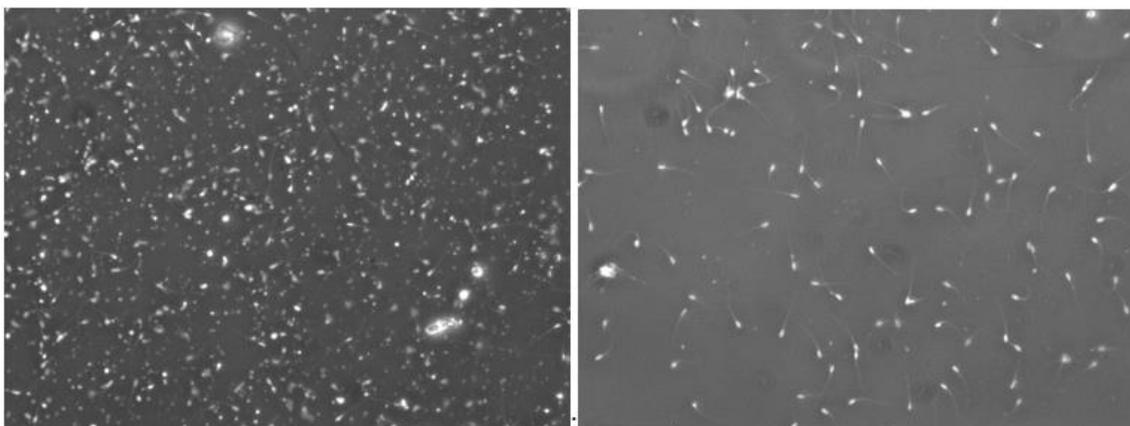


Figura 7. Semen seleccionado

Tras la centrifugación, el sobrenadante fue eliminado mediante pipeteo y el pellet fue diluido en 2 ml del mismo medio utilizado antes de la centrifugación. En este momento se obtuvieron las muestras control T0 (tiempo 0) para el análisis del efecto de los diferentes tiempos de incubación. De estas muestras se evaluó su motilidad, concentración, estado del acrosoma y viabilidad.

El resto del contenido de cada tubo se pasó a una placa P35 y se incubó en condiciones de 5% CO₂, 37,5% y humedad hasta saturación. A las dos horas de incubación se obtuvo la muestra T1 (tiempo 2h) y a las 4 horas la muestra T2 (tiempo 4h). Al igual que con la muestra T0, se evaluó también las características seminales de motilidad, concentración, estado del acrosoma y viabilidad.

3.5. Experimento 2. Evaluación del efecto de la albúmina sérica bovina sobre la capacitación y reacción acrosómica del semen de conejo

En este segundo bloque experimental se centró el trabajo sobre los resultados obtenidos del experimento 1, donde se observó que el tratamiento con solución TALP suplementada con 5% de BSA ofrecía los mejores resultados. Por ello, se utilizó para los tratamientos del experimento 2 la solución TALP-5%BSA. Para evaluar la capacitación se utilizó ionóforo de calcio A23187 como inductor de la reacción acrosómica.

Para este experimento se utilizaron en cada sesión 2ml de semen obtenidos a partir de los eyaculados de diferentes machos. Después, se evaluaron las características seminales de este *pool* de eyaculados midiendo su motilidad, subpoblaciones según la motilidad, concentración y formas anormales.

A este *pool* de eyaculados se le aplicaron 3 tratamientos diferentes y una muestra se dejó como control. Los tratamientos empleados se muestran en la Figura 12.

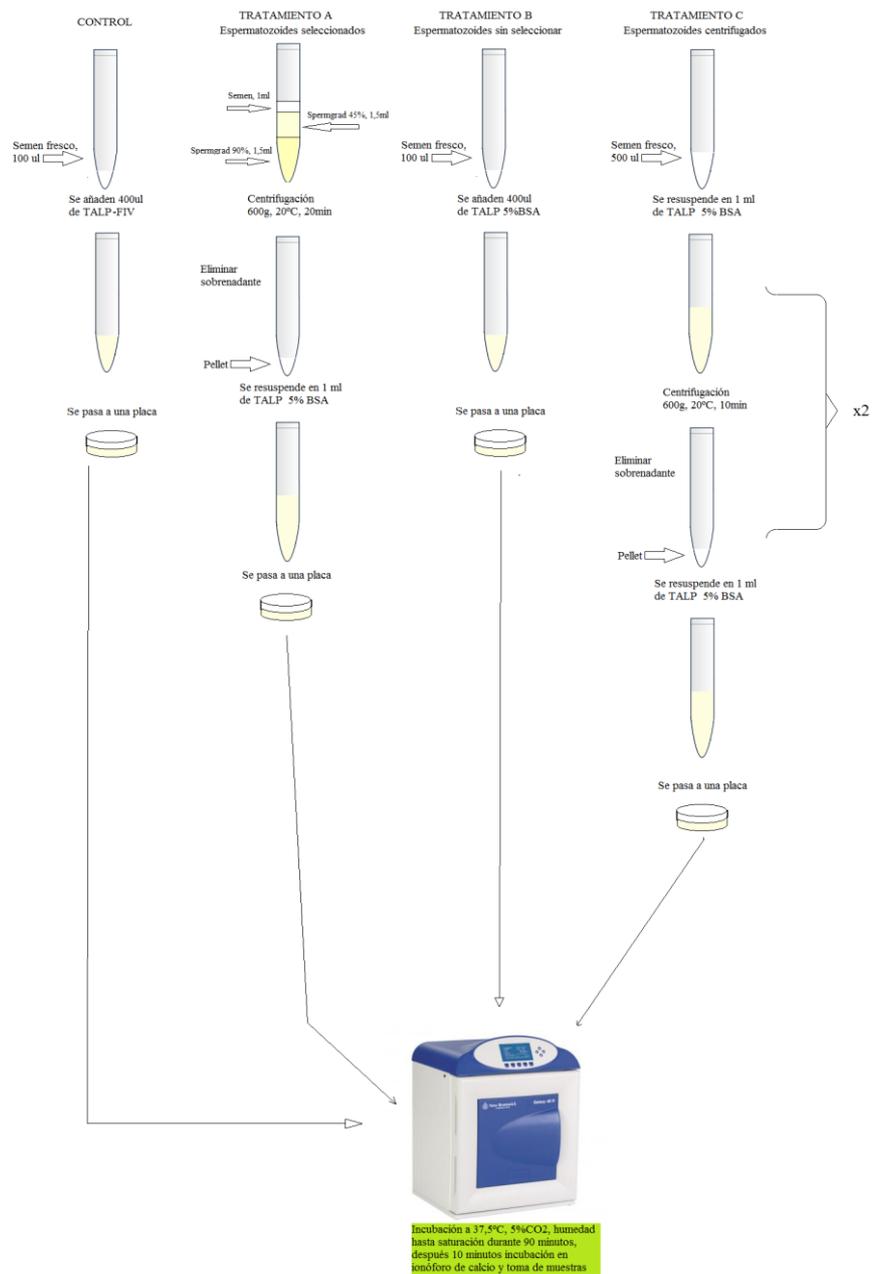


Figura 8. Esquema del Experimento 2

Tratamiento A: Los espermatozoides se seleccionaron del resto de partículas presentes en el eyaculado mediante un gradiente de densidades de sílice coloidal (SPERMGRAD™ Vitrolife ©) de 2 capas, al 45 y al 90%. Tras la centrifugación, el sobrenadante fue eliminado y el pellet fue diluido en 1ml de solución TALP-5%BSA. Después se añadieron 500 µL a una placa NUNC® (Thermoscientific™) y se dejó incubar 90 minutos a 37,5°C, 5% CO₂ y humedad hasta saturación. Tras la incubación se añadieron 6µL de ionóforo de calcio A23187 y se dejó incubar durante 10 minutos más. Tras esto se tomaron muestras para evaluar la motilidad, subpoblaciones según la motilidad y estado del acrosoma.

Tratamiento B: A partir de la muestra de semen se realizó una dilución 1:5 en la solución TALP-5%BSA, y tras esto se pasaron 500 µL a una placa NUNC®. Al igual que antes, se dejó incubar 90 minutos y después se añadieron 6µL de ionóforo de calcio A23187, dejándose incubar durante 10 minutos más. Tras esto se tomaron muestras para evaluar la motilidad, subpoblaciones según la motilidad y estado del acrosoma.

Tratamiento C: La muestra de semen fue diluida 1:2 en la solución TALP-5%BSA, y ésta se centrifugó a 600g, 20°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y de nuevo se adicionó al pellet 1 ml de TALP -5% BSA, tras lo cual se repitió la centrifugación y se resuspendió el pellet por segunda vez. De este tubo se añadieron 500 µL a una placa NUNC® y se dejó incubar 90 minutos. Después se indujo la reacción acrosómica con 6µL de ionóforo de calcio A23187, dejándose incubar durante 10 minutos más. Tras esto se tomaron muestras para evaluar la motilidad y estado del acrosoma.

3.6. Experimento 3. Evaluación *in-vivo* de la capacitación

3.6.1. Obtención de los ovocitos

La superovulación fue inducida en 12 conejas línea A con 18,75 IU de rhFSH +10% de rhLH (1,87 IU, Luveris®, Serono, MW, London, UK) distribuidas en 5 dosis subcutáneas cada 12 horas durante 3 días. Fueron sacrificadas tras 14-15 horas de la inducción a la ovulación, y su tracto reproductor fue extirpado de inmediato. Los ovocitos fueron recuperados por perfusión de cada oviducto con 5 ml de solución pre-incubada Dulbecco tampón fosfato salino sin cloruro cálcico (DPBS) suplementado con 0,1% (w/v) de BSA. Finalmente los ovocitos fueron tratados durante 15 minutos a temperatura ambiente con 0,1%(w/v) de hialuronidasa en DPBS, y las células del cúmulo fueron eliminadas mediante pipeteo mecánico.

3.6.2. Fecundación *in vitro*

De diez a veinte ovocitos desnudos en MII fueron introducidos en una placa NUNC que contenía 500µL del medio de fecundación TALP-FIV (Tyrode's albumina lactato piruvato modificado, con la siguiente composición: 112 mM de NaCl, 3,219 mM de NaH₂PO₄ H₂O, 2,041 mM Ca₂Cl H₂O, 0,492 mM de Mg₂Cl 6H₂O, 5 mL/L de gentamicina (Gibco 15710-049), 2 mL/L de rojo fenol, 992 mL/L de H₂O, 3,1 mL/L de lactato de sodio, 1,2491 mL/L de ácido pirúvico, 23,806 mM de NaHCO₃, 0,2 g/L de BSA). Un millón de espermatozoides de los diferentes grupos experimentales del Experimento 2 (Tratamiento A, B y C) fueron co-incubados con cada ovocito (Figura 9).

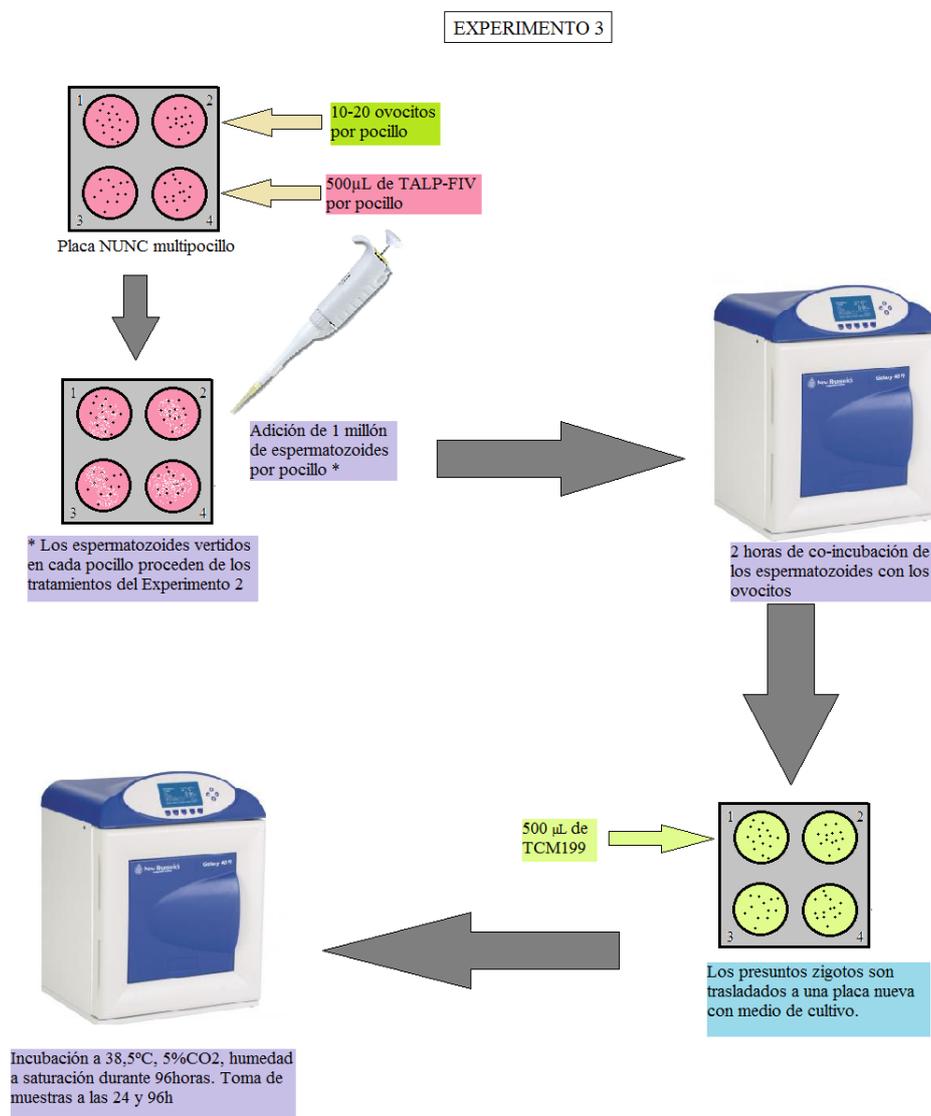


Figura 9. Esquema del Experimento 3. FIV

Tras 2 horas de co-incubación se transfirieron los presuntos cigotos de los diferentes grupos a pocillos de placas NUNC[®] con 500 μ L de medio de cultivo TCM199, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (penicilina G sódica 300.000 IU, penicilina G procaína 700.000 IU y sulfato de dihidrostreptomicina 1250 mg, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España). Se incubaron durante 96 horas en una estufa bajo unas condiciones de temperatura y atmósfera controladas 38,5°C, 5,0% de CO₂ y humedad a saturación. Se controló la tasa de división a las 24h y la de desarrollo a mórula o blastocisto temprano a las 96h.

3.7. Análisis estadístico

3.7.1. Obtención y análisis de las subpoblaciones espermáticas

La diferenciación de las subpoblaciones espermáticas se realizaron con la versión 3.1 del software R (R Core Team, 2014) y el paquete estadístico cluster (Maechler *et al.*, 2014).

Para el agrupamiento de los espermatozoides se procedió a generar diferentes clusters en base al criterio de Ward's o método de mínima varianza de Ward's. El método de Ward's une clusters de manera que se maximiza la verosimilitud inclusive en los casos en que los datos puedan proceder de mezclas de distribuciones normales multivariantes. Para estimar el número óptimo de clusters se empleó el Cubic Clustering Criterion (CCC).

Una vez realizadas las subpoblaciones espermáticas, a cada espermatozoide se le asignó la pertenencia a una de las diferentes subpoblaciones y se calculó y analizó la frecuencia de distribución de las distintas subpoblaciones mediante una Ji-cuadrado para cada uno de los medios y tiempo de incubación en el Experimento 1, y para cada tratamiento en el Experimento 2 (Statgraphics centurión, XVI).

3.7.2. Análisis de los parámetros espermáticos y las tasas de fecundación y desarrollo.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en el Experimento 1 tanto de los parámetros de motilidad como de viabilidad, anormales y reacción acrosómica, se utilizó el programa Statgraphics Centurión XVI[®]. Se realizó un análisis de la varianza usando un modelo lineal generalizado (GLM) que incluía los factores fijos f Tiempo (0, 2 y 4 horas) y medio (TALP - 0%BSA, TALP-5% BSA, TALP-5% BSA-FAF) y su interacción.

En el Experimento 2, se realizó un análisis de la varianza con un GLM para los parámetros de evaluación espermática de los diferentes medios incubados con ionóforo (Control, TALP-5%BSA seleccionado con gradientes de densidad, TALP-5%BSA sin seleccionar y TALP-5%BSA centrifugado).

Las tasas de fecundación (división a 24 h) y desarrollo a 96h fueron analizados mediante una Ji-cuadrado con corrección de Yates.

Las diferencias con $P < 0,05$ se consideraron significativas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.Experimento 1. Evaluación del efecto de los medios TALP con albúmina sérica bovina y el tiempo de incubación sobre las características del semen de conejo

4.2.Experimento 2. Evaluación del efecto de la albúmina sérica bovina sobre la capacitación y reacción acrosómica del semen de conejo

4.3.Experimento 3. Evaluación *in-vivo* de la capacitación

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Experimento 1. Evaluación del efecto de los medios TALP con albúmina sérica bovina y el tiempo de incubación sobre las características del semen de conejo

En la Tabla 1 pueden observarse los parámetros de motilidad, viabilidad y acrosoma reaccionado en cada medio (TALP-0%BSA, TALP- 5%BSA, TALP-5%BSA-FAF) y para los distintos tiempos de incubación (0, 2 y 4 horas).

Tabla 1. Valores de motilidad, viabilidad y acrosomía en función del tiempo.

Tiempos de incubación	Parámetro a evaluar	TALP-0%BSA lsm±es	TALP-5%BSA lsm±es	TALP-5%BSA- FAF lsm±es	Total lsm±es
	Móviles				
0		87,8±2,67	94,1±2,67	87,4±2,67	89,8±1,54
2		86,6±2,67	92,1±2,67	85,0±2,67	87,9±1,54
4		79,4±2,67	91,0±2,67	84,4±2,67	84,9±1,54
Total		84,6±1,54 ^b	92,4±1,54 ^a	85,6±1,54 ^b	87,5±0,89
	Vivos				
0		56,5±3,00	86,4±3,00	78,3±3,00	73,7±1,74
2		53,5±3,00	83,6±3,00	75,5±3,00	70,9±1,74
4		58,1±3,00	86,0±3,00	74,2±3,00	72,7±1,74
Total		56,0±1,74 ^c	85,3±1,74 ^a	76,0±1,74 ^b	72,5±1,00
	Vivos AR				
0		4,05±0,671	0,95±0,671	2,32±0,671	2,44±0,387
2		1,85±0,671	0,97±0,671	1,25±0,671	1,36±0,387
4		2,38±0,671	0,61±0,671	3,54±0,671	2,18±0,387
Total		2,8 ± 0,387 ^b	0,84±0,387 ^a	2,37±0,387 ^b	1,99±0,224

30 muestras (10 por medio/10 por tiempo).

lsm±es: medias ajustadas por mínimos cuadrados± estándar error de la media.

Valores con distinto superíndice son estadísticamente diferentes P<0,05.

La motilidad, viabilidad y porcentaje de acrosomas reaccionados no fueron afectados por el tiempo de incubación. Sin embargo, se observó tanto un incremento significativo de la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides como una reducción de los acrosomas reaccionados en el medio TALP-5%BSA frente a los medios TALP-0%BSA y TALP-5%BSA-FAF.

La BSA es considerado un agente capacitante capaz de movilizar el colesterol de las membranas espermáticas e iniciar una desestabilización de éstas que conduciría en las condiciones apropiadas a la reacción acrosómica (Go y Wolf, 1985). El porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado que se obtuvo en este trabajo sugiere, a pesar de las diferencias estadísticas, que la selección de espermatozoides, la dilución en los medios e incluso la incubación no es suficiente para inducir modificaciones en el acrosoma de los espermatozoides vivos. De hecho este estudio no busca un inductor de la reacción acrosomal, sino desencadenar los pasos iniciales de la

capacitación espermática que, no tiene por qué ser observables en términos de acrosomas reaccionados.

Sin embargo, como muestran los resultados de la Tabla 1 que el suplemento de 5% de BSA a la solución TALP no aumenta el porcentaje de espermatozoides reaccionados, sino que lo disminuye ligeramente. Esto podría deberse paradójicamente a que la BSA podría tener un ligero efecto de estabilización sobre la membrana acrosomal, efecto no previsto.

Uno de los efectos detectables en los espermatozoides que son capacitados es la alteración de los patrones de movimiento y el establecimiento de subpoblaciones con características específicas. La Tabla 2 muestra las características de movimiento para las subpoblaciones espermáticas establecidas.

Tabla 2. Características de velocidad y trayectoria de las subpoblaciones analizadas.

<i>Características de Movimiento y subpoblaciones</i>	<i>VCL</i> $\mu\text{m/s}$	<i>VSL</i> $\mu\text{m/s}$	<i>VAP</i> $\mu\text{m/s}$	<i>LIN</i>	<i>WOB</i>	<i>STR</i>	<i>ALH</i> μm	<i>BCF</i> Hz	<i>Dance</i> $\mu\text{m}^2/\text{s}$
<i>Subpoblación 1</i>	103,5 $\pm 0,24$	84,9 $\pm 0,22$	96,0 $\pm 0,23$	0,82 $\pm 0,01$	0,89 $\pm 0,01$	0,93 $\pm 0,01$	1,96 $\pm 0,01$	10,4 $\pm 0,03$	209,5 $\pm 0,96$
<i>Subpoblación 2</i>	53,0 $\pm 0,20$	42,7 $\pm 0,18$	47,4 $\pm 0,19$	0,80 $\pm 0,01$	0,89 $\pm 0,01$	0,89 $\pm 0,01$	1,43 $\pm 0,01$	8,73 $\pm 0,04$	80,6 $\pm 0,54$
<i>Subpoblación 3</i>	123,0 $\pm 0,68$	45,7 $\pm 0,41$	76,4 $\pm 0,44$	0,38 $\pm 0,01$	0,59 $\pm 0,01$	0,62 $\pm 0,01$	3,89 $\pm 0,02$	13,56 $\pm 0,07$	549,0 $\pm 6,24$

ISM+es. Medias ajustadas por mínimos cuadrados+ estándar error de la media.

Tras el análisis de clusters de las 9 variables registradas para cada uno de 15.595 espermatozoides móviles pudieron definirse tres subpoblaciones espermáticas con características diferenciales.

En la subpoblación 1 se observaron aquellos espermatozoides con una velocidad alta tanto curvilínea como rectilínea, (VCL y VSL) y trayectorias lineales (elevados índices de linealidad y rectitud representados por altos LIN y STR), así como una amplitud baja del desplazamiento de la cabeza (ALH) asociado a valores medios-altos de Dance, que nos indican que los espermatozoides abarcan un área relativamente alta en su movimiento. Esta subpoblación debe ser la predominante en los eyaculados fértiles de conejo.

En la subpoblación 2 se observó una baja velocidad asociada a un trayectoria lineal alta (VCL y LIN elevados) y batidos de cabeza poco vigorosos que abarcaron poca área (ALH y Dance bajos). Esta subpoblación muestra signos de adherencia a la cámara de valoración probablemente debida a que sus membranas están alteradas.

La subpoblación 3, mostraba una alta velocidad curvilínea, unilinealidad baja (LIN baja), su ALH y DANCE tan elevados nos muestran una alta amplitud en los movimientos de la cabeza del

espermatozoide, por lo que podríamos referirnos a esta subpoblación como la más cercana a los fenómenos de hiperactivación de la motilidad descrita anteriormente como uno de los comportamientos de los espermatozoides capacitados (Brannigan y Lipshultz, 2008) .

En la Tabla 3 se muestran las diferentes distribuciones de las subpoblaciones en función del medio utilizado para incubar a los espermatozoides (TALP-0%BSA, TALP-5%BSA, TALP-5%BSA-FAF).

Tabla 3. Análisis de subpoblaciones espermáticas para los diferentes medios utilizados.

Medios utilizados

y distribución de subpoblaciones TALP-0%BSA TALP-5%BSA TALP-5%BSA-FAF

Subpoblación 1 (%)	61,15 ^a	45,31 ^c	51,21 ^b
Subpoblación 2 (%)	28,01 ^c	38,02 ^a	31,58 ^b
Subpoblación 3 (%)	10,84 ^b	16,67 ^a	17,22 ^a
Total espermatozoides	5151	6220	4224

Valores con distinto superíndice son estadísticamente diferentes P<0,05.

Los medios con TALP-BSA mostraron el mayor porcentaje de espermatozoides en las subpoblaciones 2 y 3, subpoblaciones, al menos la 3, cuyas características parecen indicar que se está induciendo el proceso de capacitación (Tabla 3).

Este experimento reafirma los estudios de Go y Wolf (1985), en los que se utilizó la BSA para inducir el estado capacitado a los espermatozoides de ratón. Sin embargo, nuestros resultados difieren para los datos de BSA-FAF ya que su grupo obtuvo mayores resultados con ese medio. No obstante, hay que tener en cuenta que los estudios se realizaron en ratón, y que la bioquímica de la inducción a la capacitación del espermatozoide puede ser especie-específica.

4.2. Experimento 2. Evaluación del efecto de la albúmina sérica bovina sobre la capacitación y reacción acrosómica del semen de conejo

En la Tabla 4 se observó la evaluación de la motilidad tanto total como progresiva y el porcentaje de acrosomas no reaccionados de las muestras tomadas con los diferentes tratamientos (selección de semen diluido en BSA mediante gradientes de densidad, semen diluido en BSA sin seleccionar, y semen diluido en BSA centrifugado) y una muestra control.

Tabla 4. Parámetros de motilidad, y acrosomía para las muestras tras los diferentes tratamientos e incubación con ionóforo de calcio A23187.

Parámetros y tratamientos	Control <i>lsm±es</i>	TALP-5%BSA Seleccionado <i>lsm±es</i>	TALP-5%BSA Sin Seleccionar <i>lsm±es</i>	TALP-BSA Centrifugado <i>lsm±es</i>
Móviles	82,5±8,63 ^a	65,4±8,63 ^a	80,2±8,63 ^a	33,6±8,63 ^b
Móviles progresivos	41,2±7,39 ^{ab}	21,8±7,39 ^{bc}	49,4±7,39 ^a	16,6±7,39 ^c
Acrosomas no reaccionados	94,5±4,42 ^a	92,4±4,42 ^a	86,3±4,42 ^a	64,9±4,42 ^b

5 muestras.

lsm±es. medias ajustadas por mínimos cuadrados± estándar error de la media

Valores con distinto sueríndice son estadísticamente diferentes P<0.05.

Evaluando la Motilidad, tan solo el tratamiento de centrifugación en TALP-5%BSA mostró valores significativamente más bajos que el resto de tratamientos.

Los parámetros de motilidad progresiva mostraron que no hubo diferencias significativas entre el control y el tratamiento de TALP-5%BSA seleccionado y el diluido en TALP-5%BSA, pero sí las hubo entre el TALP-5%BSA seleccionado y el diluido en TALP-5%BSA. Los tratamientos de TALP-5%BSA sin selección y el de centrifugación en TALP-5%BSA mostraron diferencias significativas en los parámetros de motilidad progresiva, siendo en la muestra centrifugada mucho menor con un 16,6%. Los tratamientos de centrifugación y de selección de espermatozoides no mostraron diferencias en la motilidad progresiva.

Al valorar los datos obtenidos al medir la reacción acrosómica, tan solo se observaron diferencias estadísticamente significativamente mayores en el tratamiento de centrifugación en TALP-5%BSA- centrifugados, siendo los que más respuesta acrosómica han dado a la incubación con ionóforo.

De los datos obtenidos se observó que la selección espermática no fue efectiva en la capacitación de los espermatozoides, ya que podría estar eliminando los prostasomas típicos de los eyaculados de conejo pero no estar eliminando las proteínas decapacitantes de origen epididimario presentes en el plasma seminal, las cuales podrán estar contribuyendo todavía a estabilizar las membranas reduciendo el posible efecto capacitante de la BSA y la posterior reacción acrosómica con el ionóforo.

Los resultados de los espermatozoides tan solo diluidos en el medio, sin centrifugar ni filtrar, no ofrecieron unos resultados significativamente distintos al control en ningún parámetro medido, esto puede ser debido a la presencia de las vesículas prostáticas (prostasomas) presentes en los eyaculados (Collodel *et al.*, 2011), las cuales al igual que las proteínas del plasma seminal, poseen un efecto decapacitante y les otorgan estabilidad a los espermatozoides. Esto es debido a que

existe una secreción de esteroides desde dichas vesículas que mantienen los niveles de esteroides de la membrana del espermatozoide estable e impidiendo así su hiperactivación y la reacción acrosómica (Mourvaki *et al.*, 2010).

Por último, en el caso de los espermatozoides seleccionados en gradiente y doblemente centrifugados se eliminaron las prostasomas y, probablemente, en el caso de la doble centrifugación, las proteínas decapacitantes fueron eliminadas o su concentración reducida por la doble dilución (este aspecto debe ser constatado en un siguiente trabajo) favoreciendo un mayor grado de capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides de este grupo.

A partir de los parámetros individuales de los 5.261 espermatozoides se definieron tres subpoblaciones espermáticas.. Las características de esas subpoblaciones se muestran en la Tabla 5, y siendo sus parámetros de motilidad espermática descritos a continuación:

Tabla 5. Características de velocidad y trayectoria de las subpoblaciones analizadas

Características de Movimiento y subpoblaciones	VCL µm/s	VSL µm/s	VAP µm/s	LIN	WOB	STR	ALH µm	BCF Hz	Dance µm²/s
Subpoblación 1	98,3 ±0,44	82,7 ±0,35	90,9 ±0,40	0,85 ±0,01	0,91 ±0,01	0,93 ±0,01	2,31 ±0,01	9,05 ±0,04	244,2 ±2,59
Subpoblación 2	40,0 ±0,19	21,2 ±0,16	27,8 ±0,15	0,56 ±0,01	0,72 ±0,01	0,72 ±0,01	1,84 ±0,01	5,46 ±0,03	84,0 ±0,80
Subpoblación 3	113,2 ±0,49	37,5 ±0,26	65,4 ±0,28	0,35 ±0,01	0,58 ±0,01	0,60 ±0,01	4,55 ±0,02	9,36 ±0,05	575,4 ±5,15

Ism±es. Medias ajustadas por mínimos cuadrados± estándar error de la media.

En la Tabla 6 se muestra la composición de las subpoblaciones en función de los 3 tratamientos utilizados y el control.

Tabla 6. Análisis de subpoblaciones espermáticas para los diferentes medios utilizados:

	Control	TALP-5%BSA Semen seleccionado	TALP-5%BSA Semen sin seleccionar	TALP-5%BSA Semen centrifugado
Subpoblación 1 (%)	55,9 ^a	20,3 ^c	39,6 ^b	17,7 ^c
Subpoblación 2 (%)	28,1 ^c	55,6 ^b	33,9 ^c	64,4 ^a
Subpoblación 3 (%)	15,9 ^c	33,3 ^a	26,4 ^b	17,9 ^c
Nº total espermatozoides	1456	1200	1454	1151

Valores con distinto superíndice en las filas son estadísticamente diferentes P<0,05.

Los patrones de movimiento de la subpoblaciones de este experimento responden a los criterios ya comentados en el experimento 1.

Para la subpoblación 1, se observaron altos índices de velocidad y progresividad, con un ALH medio y un DANCE elevado.

En el caso de la subpoblación 2 muestra valores muy bajos de velocidad, con un ALH y dance muy bajos, estos valores podrían indicarnos unos movimientos muy lentos, con bajo movimiento de la cabeza y parámetros de motilidad progresiva pobres. Población de espermatozoides con membranas alteradas y que se adhieren.

Por último, la subpoblación 3 nos muestra alta linealidad y progresividad, así como valores de ALH y DANCE muy elevados, los cuales nos indican amplitud en los movimientos de la cabeza del espermatozoide y podrían hacernos sospechar que se trata de la subpoblación de espermatozoides capacitados con signos de hiperactividad.

En este experimento el uso del ionóforo ha incrementado notablemente la frecuencia de la población 2, permaneciendo estable la subpoblación 3 y reduciendo la 1 en todos los grupos menos en el control. Si la subpoblación 2 debe corresponder a espermatozoides capacitados que han sido inducidos a la reacción acrosómica por el ionóforo, y la 3 a los inducidos a capacitarse. Los tratamientos con TALP-BSA con semen seleccionado y centrifugado deberían ser útiles para fecundar *in vitro* ovocitos en estadio de metafase II (MII).

4.3. Experimento 3. Evaluación *in-vivo* de la capacitación.

Por último se llevó a cabo un co-cultivo de los espermatozoides y óvulos en MII con el fin de valorar si los cambios producidos a nivel de los parámetros espermáticos y, consecuentemente, en frecuencia de las subpoblaciones podían ser correlacionadas con la capacidad fecundante. En la Tabla 7 se muestran los resultados del co-cultivo tras 24 y 96 horas de los tratamientos evaluados. Se establecieron, además, dos controles, el primero (negativo) con el fin de descartar divisiones partenogénéticas de los óvulos como consecuencia de extracción y cultivo, el segundo positivo, co-incubando espermatozoides obtenidos de la mezcla de eyaculados y tratados con ionóforo. Como puede observarse en la Tabla 7, en ambos casos los óvulos activados presuntamente de modo partenogénético (1 y 2 respectivamente), no se desarrollaron a blastocisto, sino que se produjo una fragmentación citoplasmática de los mismos durante el periodo de cultivo. Esta fragmentación es un proceso habitual asociado al envejecimiento de los óvulos.

Tabla 7. Resultados de la fecundación in-vitro

Grupo	Nº de óvulos MII	Divididos 24h (%)	Desarrollados 96h (%)
<i>Control – (sin semen)</i>	58	1 (1,7) ^c	0 (0) ^c
<i>Control+(con semen)</i>	52	2 (3,8) ^c	0 (0) ^c
<i>TALP-BSA Semen seleccionado</i>	60	13 (21,6) ^b	9 (15) ^b
<i>TALP-BSA Semen sin seleccionar</i>	64	5 (7,8) ^c	3 (4,7) ^{bc}
<i>TALP-BSA Centrifugado</i>	62	32 (51,6) ^a	25 (40,3) ^a

Valores con distinto superíndice en las columnas difieren estadísticamente. (P<0,05).

Cuando los espermatozoides fueron seleccionados, centrifugados y diluidos en TALP-5%BSA, o solo diluidos en solución TALP-5%BSA, en todos los grupos se obtuvieron embriones de 2-4 células tras 24 horas de cultivo y mórulas-blastocistos tempranos a las 96 horas (Tabla 7, Figura 10).



Figura 10. Cultivo de los cigotos hasta 96 horas.

En el co-cultivo de espermatozoides seleccionados se utilizaron un total de 60 óvulos maduros, de los cuales un 21,6% se habían dividido a las 24h y de estos, un 15% llegaron a la fase de mórula/blastocisto temprano. En el caso del semen sin seleccionar diluido en TALP-BSA, un 7,8% de los 64 ovocitos utilizados llegaron a dividirse a las 24h, pero solo el 4,7% alcanzaron estadios más avanzados en la toma de muestras a las 96 horas. Por último, el tratamiento de centrifugación con TALP-BSA fue el que mejores resultados proporcionó, de los 62 ovocitos maduros en metafase II, el 51,6% alcanzó los estadios de 2-4 células a las 24 horas y un 40,3% el estadio de mórula o blastocisto temprano a las 96 horas.

Los resultados de este experimento sugerirían que una fracción de los espermatozoides del tratamiento de TALP-BSA-centrifugación alcanzaba el estado de capacitación suficiente para que con la ayuda del ionóforo se inicie la reacción acrosómica, hecho que favorece que durante el co-cultivo con los óvulos, en torno al 50% de ellos puedan ser fecundados. Cuando analizamos las

subpoblaciones resultantes de este tratamiento, se observó que la subpoblación 2 presentaba unas características de movimiento, quizá diferentes de las esperadas (hipermotilidad) pero, sí pudo observarse que la valoración de los parámetros de movilidad resultaba alterada por la elevada adherencia de los espermatozoides (Tablas 4, 5 y 6). Esta adherencia pudo ser debida a la modificación de la membrana plasmática y acrosomal que se asocian a los procesos de capacitación y reacción acrosómica, pudiendo ser ésta la subpoblación que recoge los espermatozoides con capacidad fecundante.

El procedimiento de doble centrifugación y dilución en TALP-BSA permitió alcanzar hasta 40% de tasas fecundación en términos del mórula o blastocisto. La práctica eliminación de elementos decapacitantes del plasma seminal como algunas proteínas y/o vesículas por la centrifugación y la modificación probable que la BSA, asociada al medio TALP, realiza sobre las membranas espermáticas a nivel de iones y colesterol podrían ser los responsables del incremento de capacidad fecundante de los espermatozoides de conejo.

Las tasas de fecundación y desarrollo obtenidas fueron similares o mayores a las obtenidas por Brackett y Oliphant (1975), que utilizando un medio con una mayor concentración de cloruro sódico y de bicarbonato (HIS) consiguieron capacitar espermatozoides de conejo, logrando un 34% de tasa de fecundación valorada a las 27 horas en el estadio 2-4 células (Zeng *et al.*, 1999), siguiendo el método de Brackett y Oliphant (1975) pero pre-incubando el semen entre 8 y 12 horas tras el tratamiento con el medio HIS obtuvieron un 85% de óvulos fecundados y desarrollados a blastocisto. Desgraciadamente, estos resultados no han podido ser reproducibles en nuestro laboratorio ni en equipos afines en los últimos años. Otros agentes capacitantes como la heparina habitual en la capacitación de espermatozoides o medios con epinefrina-penicilamina-hipotaurina no inducen la capacitación en conejo. Minelli *et al.* (2001) alcanzó un 50% de óvulos fecundados tras centrifugación y dilución del semen en un medio base con BSA pero utilizando IGFI como inductor tanto de la capacitación como de la reacción acrosómica. A pesar de que el uso de la albúmina sérica bovina en medio TALP asociado a la centrifugación nos permite conseguir buenas tasas de fecundación *in vitro*, todavía es necesario buscar otras estrategias mucho más eficaces.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Los resultados de estos experimentos han demostrado que el uso de la albúmina sérica bovina, en combinación con solución TALP y una doble centrifugación, tiene un efecto capacitante sobre los espermatozoides de conejo. Sin embargo, esta capacitación es insuficiente para lograr un procedimiento eficiente de fecundación *in vitro* en dicha especie.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-HALIM, A.; BAILEY, J.L.; BAYARD, T.J.; STOREY, L.B. AND HEYNER, S. (1996). A comparison of three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 11(4):741-745.
- AGARWAL, A.; SAID, T. M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, 9(4):331-345.
- AHUJA, K-K.; (1985) Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. *Am J Anat*, 114:207-225.
- ÁLVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. (1983). Taurine, hypotaurine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod*, 29: 548-555.
- AUSTIN, C.R. (1951). Observation on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci*, 581-96.
- AUSTIN, C.R.; BISHOP, M.W.H. (1958). Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc. Roy. Soc.*, 149:234-240.
- BELMONTE, S.A.; LOPEZ, C.I.; ROGGERO, C.M.; DE-BLAS, G.A. ; TOMES, C.N. ; MAYORGA, L.S. (2001), Cholesterol content regulates acrosomal exocytosis by enhancing Rab3A plasma membrane association. *Developmental Biology*, 285(2)393-408.
- BOITI, C.; CASTELLINI, C.; THEAU-CLÉMENT, M.; BESENFELDER, U.; LIGUORI, L.; RENIERI, T.; PIZZI, F. (2005). Guidelines for the handling of rabbit bucks. *World Rabbit Science*, 13:71 - 91.
- BRACKETT, B.C.; BOUSQUET, D.; DRESSEL, M.A. (1982). *In vitro* Sperm Capacitation and *In vitro* Fertilization with Normal Development in the Rabbit. *American Society of Andrology*, 3:402-411.
- BRACKETT, B.C.; OLIPHANT, G. (1975). Capacitation of Rabbit Spermatozoa *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 12:260-274.
- BRANNIGAN, R, LIPSHULTZ, L. (2008), Sperm Transport and Capacitation, *Glob. libr. women's med*, (ISSN: 1756-2228)
- BREITBART, H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2):139-44.
- BRUN, J.M.; THEAU-CLÉMENT, M.; BOLET, G. (2002). The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 70, 139-149.
- CASTELLINI, C. (2011) Role of rabbit prostate granules on sperm viability and acrosome reaction evaluated with different methods. *Theriology*, 77(5):1021-1026

- CHANG, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature*, 168:697-698.
- CHENG, F.P.; FAZELI, A.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.M.; COLLENBRANDER, B. (1996). Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*, 17(6):674-82.
- CONTRERAS, F.X.; SANCHEZ-MAGRANER, L.; ALONSO, A.; GONI, FM. (2010). Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. *FEBS Lett*, 584, 1779– 1786.
- COLLODEL, G.; CARDINALI, R.; MORETTI, E.; MATTIOLI, S.; RUGGERI, S.;
- COY, P.; GADEA, J.; ROMAR, R.; MATÁS, C.; GARCÍA, E. (2002). Effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and *in vitro* development in pigs. *Reproduction*, 124(2):279-88.
- DAPINO, D.G.; MARINI, P.E.; OCABADA, M. (2006). Effect of heparin on *in vitro* capacitation of boar sperm. *Biological Research*, 39(4):631-639.
- DEMOTT, R.P.; SUAREZ, S.S. (1992). Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol. Reprod*, 46:779-785.
- ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*, 8:11-29.
- FERRAMOSCA, A.; Zara, V. (2014) Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation, *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 902953, 8 pages
- FLORMAN, H.M.; CORRON, M.E.; KIM, T.D., BADCOCK, D.F. (1992) Activation of the voltage-dependen calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.*, 152:304-314.
- FRASER, L.R. (1998). Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction*, 13:9-19.
- FRIEND, D.S.; ORCI, L.; PERRELET, A.; YANAGIMACHI, R. (1977). Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J Cell Biol*, 74(2):561-77.
- GADELLA, B.M. (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci.*, 107:229.
- GADELLA, B.M.; HARRISON, R.A. (2000).The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, 127:2407–20.
- GILBERT, B.R.; COOPER, G.W.; GOLDSTEIN, M. (s.f.) Semen Analysis in the Evaluation of Male Factor Subfertility. *Urologic Practice*.

- GO, K.J.; WOLF, D.P. (1985). Albumin-Mediated Changes in Sperm Sterol Content During Capacitation, *Biology of Reproduction*, 32:145-153.
- GOPALKRISHNAN, K.; PADWAL, V.; BALAIAH, D. (2000). Does seminal fluid viscosity influence sperm chromatin integrity? *Institute for Research in Reproduction*, 45(2):99-103.
- GORDON, I.; Y K.H. LU. (1990). Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriology*, 33(1):77-87.
- GRASA, P.; PÉREZ-PÉ, R.; BÁQUENA, O.; FORCADA, F.; ABECIA, A., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. (2004). Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *Journal of Andrology*, 6:982-990.
- GRUNEWALD, S.; MISKA, W.; MISKA, G.; RASCH, M.; REINHARDT, M.; GLANDER, H.J.; PAASCH, U. (2007). Molecular glass wool filtration as a new tool for sperm preparation. *Human Reproduction*, 22:1405-1412.
- HARASYMOWYCZ, J.; BALL, L.; SEIDEL, G.E. (1976). Evaluation of bovine spermatozoal morphologic features after staining or fixation. *American Journal of Veterinary Research*, 37(9):1053-7.
- HIDALGO, C.O.; TAMARGO, C.; DIEZ, C. (s.f.). Análisis del semen bovino. *Boletín informativo del SERIDA*, 2:39-42.
- HILLE, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.
- HWANG, K.; LAMB, D.J. (2013). The sperm penetration assay for the assessment of fertilization capacity. *Methods in Molecular Biology*, 927:103-111.
- IJAZ, A.; HUNTER, A.G. (1989) Evaluation of Ca free Tyrodes capacitation Medium for Use in Bovine *In vitro* Fertilization. *J. Dairy. Sci.*, 72:3280--3285
- INOUE, M.; WOLF, D. P. (1975). Fertilization associated changes in the murine zona pellucida: a time sequence study. *Biol. Reprod.*, 13:546-551.
- JAMEEL, T. (2008). Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, 58(2):71-4.
- JOHNSON, A.; BASSHAM, B.; LIPSHULTZ, L.I.; LAMB, D.J. (1995). A quality control system for the optimized sperm penetration assay. *Fertility and Sterility*, 64(4):832-7.
- KATZ, D.F.; YANAGIMACHI, R.; DRESDNER, R.D. (1978). Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation. *J. Reprod. Fertil.*, 52:167-172.
- KOUBA, A.J.; ATKINSON, M.W.; GANDOLF, A.R.; ROTH, T.L. (2001). Species-specific sperm-egg interaction affects the utility of a heterologous bovine *in vitro* fertilization system for evaluating antelope sperm. *Biology of Reproduction*, 65(4):1246-1251.

- KRISFALUSI, M.; MIKI, K.; MAGYAR, P. L.; O'BRIEN, D. A. (2006) "Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa," *Biology of Reproduction*, (75)2:270–278, 2006.
- LEE, M.A.; STOREY, B.T. (1986). Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs; Mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. . *Biol. Reprod.*, 34:349-356.
- LEIBFRIED, M.L.; BAVISTER, B.D. (1982) Effects of epinephrine and hypotaurine on in-vitro fertilization in the golden hamster. *J. Reprod. Fert*, 66:87-93.
- Livestock production. *Theriogenology* 33:77-87.
- MAECHLER, M.; ROUSSEUW, P.; STRUYF, A.; HUBERT, M.; HORNIK, K. (2014). Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 1.15.2.
- MCNUTT, T.L.; KILLIAN, G.J. (1991). Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation *in vitro*. *Journal of Andrology*, 12(4):244-52.
- MEIZEL, S.; LUI, C.W.; WORKING, P. K.; MRSNY, R.J. (1980). Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Development, Growth and Differentiation*, 22(3):483-494.
- MEIZEL, WORKING, P. K. (1980). Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reaction by catecholamines *in vitro*. *Biol. Reprod.* 22:211-216.
- MICHELMANN, H.W. (1995). Minimal criteria of sperm quality for insemination and IVF therapy. *International Journal of Andrology*, 18(2):81-87.
- MINELLI, A.; LIGUORI, L.; COLLODEL, G.; LATTAIOLI, P.; CASTELLINI, C. (2001) Effects of the purified IGF-I complex on the capacitation and acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *J Exp Zool*, 290(3):311-317
- MOURVAKI, E.; CARDINALI, R.; ROBERTI, R.; DAL BOSCO, A.; CASTELLINI, C. (2010) Desmosterol, the main sterol in rabbit semen: Distribution among semen subfractions and its role in the *in vitro* spermatozoa acrosome reaction and motility. *Asian J Androl*, 12:862–870
- OKAMURA, N.; TAJIMA, Y.; SOEJIMA, A.; MASUDA, H.; SUGITA, Y. (1985), Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 260(9):699–705.
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44(6):859-69.
- PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A.; FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. (2012). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility, *International Journal of Andrology*, 35(2):109–124.

- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1(2):63–68.
- R CORE TEAM (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- RUBIO-GUILLÉN, J.L.; QUINTERO-MORENO, A.A.; GONZÁLEZ-VILLALOBOS, D.M. (2009). Effect of Cryopreservation on Integrity of Plasmatic and Acrosomal Membrane of Bulls Sperm. *Rev. Cient. Maracaibo*, 19(4):708-710.
- RUIZ-PESINI, E.; DIEZ-SANCHEZ, C.; LOPEZ-PEREZ, M. J.; ENRIQUEZ, J. A. (2007) “The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process?” *Current Topics in Developmental Biology*, 77:3–19, 2007.
- SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. (1996). Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, 24(2):167–173.
- STENDARDI, A.; FOCARELLI, R.; PIOMBONI, P. (2011) Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during *in vitro* capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 34(3):247–255.
- STEWART-SAVAGE, J. (1993). Effect of bovine serum albumin concentration and source on sperm capacitation in the golden hamster. *Biology of Reproduction*, 49(1):74-81.
- TATENO, H.; KRAPF, D.; HINO, T.; SANCHEZ-CÁRDENAS, C.; DARSZON, A.; YANAGIMACHI, R.; VISCONTI, P.E. (2013). Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing *in vitro* without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. No page
- TESARIK, J. (1985). Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 74(2):383-388
- THÉRIEN I, BLEAU G, MANJUNATH P. (1995). Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction*, 52(6):1372-9.
- TULSIANI, D.R.P.; ABOU-HAILA, A.; LOESER, C.R.; PEREIRA, B.M.J. (1998). The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization. *Experimental Cell Research*, 240:151–164.
- VASAN, S. S. (2011). Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian Journal of Urology*, 27(1): 41–48.

- VISCONTI, P.E.; BAILEY, J.L.; MOORE, G.D.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa: Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121:1129-1150.
- VISCONTI, P.E.; KRAPF, D.; DE-LA-VEGA-BELTRAN, J.L.; ACEVEDO, J. J.; DARSZON, A. (2011), Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation, *Asian Journal of Andrology*, 13:395–405
- VISCONTI, P.E.; MOORE, G.D.; BAILEY, J.L.; LECLERC, P.; CONNORS, S.A.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121(4):1139-50.
- YAMAGINACHI, T. (1994). Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*, 2:189-317.
- ZENG, S.M.; ZHU, S. E.; WANG, Y.S.; CHEN, X. J.; ZHANG, Z.C.; CHEN, Y.F. (1999) An Efficient Method For *In vitro* Fertilization In Rabbits, *Animal Biotechnology*, 10 (1&2):15-23
- ZENG, Y.; CLARK, E.N.; FLORMAN, H.M. (1995) Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.*, 171:554–563
- ZEGINIADOU, T.; PAPADIMAS, J.; MANTALENAKIS, S. (2000). Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrology*, 32(6):335–343.